





دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی قزوین

دانشکده پزشکی شهید بابایی

### هوالشافی

جلسه دفاع از پایان نامه جهت اخذ دکترای حرفه ای پزشکی

بررسی ارتباط پلی مورفیسم **rs222859** در ژن **YBX2** با میزان بیان آن در نمونه خون و

بافت بیضه مردان آزواسپرم

استاد راهنما: دکتر سحر مقبلی نژاد

استاد مشاور: دکتر مرجان نصیری اصل

نگارش: غلامرضا نعمت الهی

شماره پایان نامه

بهار 95

## فهرست

- 1- فصل اول مقدمه و اهمیت موضوع ..... 6-29
- 2- فصل دوم مرور و بررسی متون ..... 30-34
- 3- اهداف و فرضیات ..... 35-36
- 4- فصل سوم مواد و روش کار ..... 36-56
- 5- فصل چهارم نتایج و یافته ها ..... 57-60
- 6- فصل پنجم بحث و نتیجه گیری پیشنهادها ..... 61-64
- 7- فصل ششم فهرست منابع ..... 65-75

## فهرست اشکال و جداول

11	1- شکل 1
13	2- شکل 2
14	3- شکل 3
15	4- شکل 4
16	5- شکل 5
46	6- شکل 6
54	7- شکل 7
55	8- شکل 8
59	9- شکل 9
60	10- شکل 10
9	11- جدول 1
43	12- جدول 2
48	13- جدول 3

## چکیده:

مطالعات مدل حیوانی، نقش بالقوه ژن MSY2 در روند اسپرماتوژنز نشان داده اند. برخی از جهش ها در این ژن که با ناباروری مردان انسان همراه است پیشنهاد شده اند. در این مطالعه، پلی مورفیسم ژن YBX2 exon1 بررسی شده است. در مجموع 156 مرد مورد بررسی قرار گرفت. آنها شامل 96 مرد با اسپرم زایی طبیعی، 60 نفر با آزواسپرمی غیر انسدادی بودند. ما DNA را از خون و بافت بیضه نمونه ها استخراج کردیم، پلی مورفیسم exon1 با استفاده از روش تعیین توالی آنالیز شد. نتایج توالی یابی نشان داد که در بین مطالعه پلی مورفیسم ها، فراوانی ژنوتیپ TT در پلی مورفیسم rs222859 در بیماران آزواسپرمی نسبت به گروه کنترل به طور قابل توجهی بالاتر بود ( $P < 0.001$ ).

با توجه به نتایج بدست آمده، ژن YBX2 ممکن است نقشی در تولید مثل مرد بازی کند. تغییرات این ژن ممکن است در آزواسپرمی در میان ایرانیان آزواسپرمی ایجاد شده باشد.

کلمات کلیدی: ژن YBX2، ناباروری، آزواسپرمی

# فصل اول

## مقدمه

و

## اهمیت موضوع

## ناباروری مردان :

ناباروری، ناتوانی جنسی فعال است، زن و شوهر که بدون استفاده از وسایل پیشگیری از بارداری در عرض یک سال قادر به رسیدن به حاملگی نیستند زوج نابارور خوانده می شوند(1). حدود 15 درصد از زوج ها ظرف مدت 1 سال به بارداری دست نمی یابند، و در نهایت کمتر از 5 درصد بچه دار نمی شوند. در 10-15٪ از زوج ها با استفاده از کار تشخیصی معمول هیچ علتی از ناباروری یافت نمی شود(2). فاکتورهای مردانه مسئول 50٪ از موارد ناباروری است (3). 30 تا 40 درصد از موارد علت ناباروری مردان مشخص<sup>1</sup> نیست (3). لازم به ذکر است که باید بین ناباروری با علت غیر قابل توضیح<sup>2</sup> و ناباروری مردان ایدیوپاتیک تفاوت قائل شد. خط تقسیم بین آنها تجزیه و تحلیل مایع منی است که در گروه های غیر قابل توضیح طبیعی بوده و در ناباروری ایدیوپاتیک غیر طبیعی است(4). برای آنالیز سمن یک سری از پارامترها وجود دارد که توسط WHO ارائه شده (جدول 1-2)(3).

در این افراد با ناباروری نامشخص حالت های مختلفی ممکن است مشاهده گردد که عبارتند از :

(1) کاهش تعداد اسپرم (اولیگو اسپرمیا)<sup>3</sup>

(2) کاهش حرکت اسپرم (آستنو اسپرمیا)<sup>4</sup>

(3) فرمهای بدشکل اسپرماتوزوآ از نظر ظاهری (تراتواسپرمیا)<sup>5</sup>

(4) گاهی 3 مورد بالا با هم بوده و اولیگو استنو تراتو اسپرمیا نامیده می شود.<sup>6</sup>

(5) عدم مشاهده اسپرم (آزوسپرمیا)<sup>7</sup>(3)

---

<sup>1</sup> . Idiopathic Infertility

<sup>2</sup> . Unexplained male infertility

<sup>3</sup> . Oligozoospermia

<sup>4</sup> . Asthenozoospermia

<sup>5</sup> . Teratozoospermia

<sup>6</sup> . Oligo-astheno-teratozoospermia

<sup>7</sup> . Azoospermia

## فاکتورهای پیش آگهی ناباروری مردان :

عوامل اصلی زیر پیش آگهی در ناباروری را تحت تاثیر قرار می دهد :

(1) سن و وضعیت باروری شریک زن

(2) مدت زمان ناباروری

(3) ناباروری اولیه و ثانویه

(4) نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل مایع منی (2).

سن زن و کاهش ذخیره تخمدان مرتبط با آن مهم ترین متغیر مؤثر بر نتیجه ی تولید مثل هم بصورت خود به خودی و هم با کمک تکنیک های باروری است. بررسی شریک مرد شامل یک تاریخچه پزشکی کامل و معاینه فیزیکی با توجه به طرح استاندارد منتشر شده توسط WHO باید باشد، به طوری که هر عامل مرتبط با ناباروری مردان را می تواند تشخیص داده و در صورت امکان تحت درمان قرار داد. غربالگری هورمونی می تواند محدود به تعیین سطح هورمون های  $FSH^8$ ،  $LH^9$  و تستسترون باشد که در تمام مردان نابارور می بایست انجام گیرد. در آزواسپرما، تمایز بین علل انسدادی و غیر انسدادی بسیار مهم است. یک معیار بارزش برای پیش بینی منطقی آزواسپرما، انسدادی سطح نرمال هورمون  $FSH$  با حجم بیضه دوطرفی نرمال است. با این حال 29 درصد از مردان با سطح نرمال  $FSH$  اسپرماتوزن ناقص را نشان می دهند (2). اسپرماتوزن ناقص معمولاً با افزایش در میزان سطح هورمون  $FSH$  نمونه خون همراه است (1). بیوپسی بیضه را می توان هم به دلایل تشخیصی و هم درمانی انجام داد (2). اسپرماتوزوای بیضه می توانند با موفقیت برای تزریق داخل سیتوپلاسمی استفاده شوند. در 60٪ موارد آزواسپرما، غیر انسدادی، اسپرماتوزوآ

---

<sup>8</sup>.Follicle-stimulating Hormone

<sup>9</sup>.Luteinising Hormone



توسط تکنیک های بازیابی اسپرم<sup>10</sup> از مردانی که کاندیدای انجام این روش هستند به دست می آیند و می بایست بدرستی مشاوره ژنتیک شوند، چراکه فاکتورهای ژنتیکی در به وجود آوردن آزواسپرمی غیر انسدادی نقش اصلی را بازی می کنند. میزان حاملگی و تولد نوزاد زنده در آزواسپرمی غیر انسدادی با استفاده از اسپرم های بدست آمده از بیضه و تکنیک های کمک باروری 30 تا 50 درصد است

جدول 1. پارامترهای صحیح آنالیز اسپرم بر اساس پارامترهای معرفی شده توسط WHO (2).

پارامتر	مقدار
حجم سمن (میلی لیتر)	1/5(1/4-1/7)
کل تعداد اسپرم ( $10^6$ در هر بار مایع منی خارج شده)	39(33-46)
غلظت اسپرم ( $10^6$ در هر میلی لیتر)	15(12-16)
حرکت کلی اسپرم (شدید+غیر شدید.%)	40(38-42)
درصد زنده بودن اسپرم ها	58(55-63)
در صد اسپرم های نرمال از لحاظ ظاهری	4(3-4)
PH	> 7/2

### درک روند اسپرماتوژنز یک پیش شرط لازم برای درمان است :

سلولهای جنسی مردان، از ذخیره سلول های بنیادی به وجود می آیند که در داخل لوله های سمنی فروس بیضه ها در تمام طول عمر از بلوغ تا دوران پیری تکامل می یابند. فرایند تکامل سلولهای جنسی

<sup>10</sup>. Testicular Sperm Extraction

اسپرماتوژنز نامیده می شود که شامل بخش های اسپرماتوگونیوژنز<sup>۱۱</sup>، میوز، اسپرمیوژنز<sup>۱۲</sup> و اسپرماسیون<sup>۱۳</sup> می باشد (5). کاهش در تعداد اسپرماتوزوا، غالب شدن اسپرماتوزوا ناقص و یا تحرک نامناسب اسپرماتوزوا ممکن است دلیل باروری به هم ریخته و یا ناباروری یک بیمار باشد. یک ارزیابی کامل از مایع انزالی ممکن است انواعی از به هم ریختگی در مراحل مختلف اسپرماتوژنز را آشکار کند و یا عملکرد به هم ریخته بیضه ها و یا حتی سرطان بیضه اولیه را نشان دهد (6).

این وضعیت پیچیده مرحله به مرحله توضیح داده می شود :

---

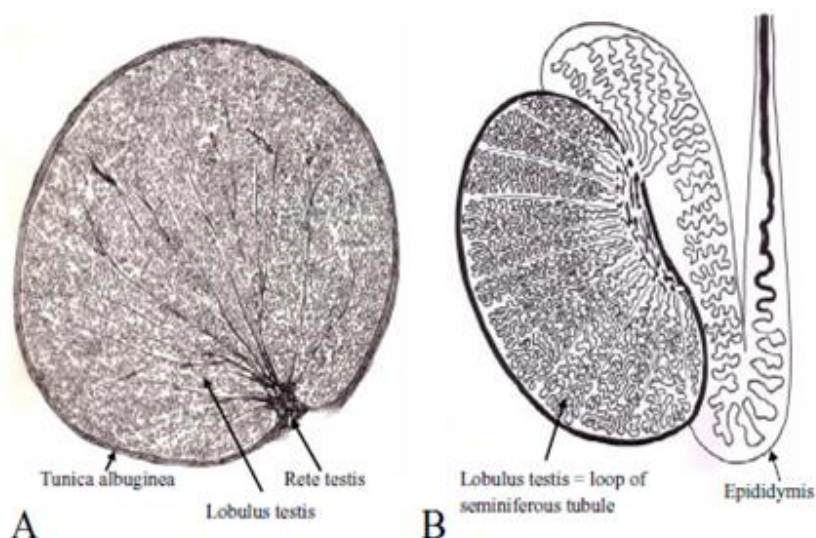
<sup>11</sup> . Spermatogoniogenesis

<sup>12</sup> . Spermiogenesis

<sup>13</sup> . Spermiation

## سازمان بندی بیضه :

بیضه های انسان دو عضو تخم مرغی شکل با قطرهای 2.5 در 4 سانتی متر هستند که در یک کیسولی از جنس بافت همبند قوی تونیکا آلبوژینا<sup>14</sup> غوطه ور شده است (شکل 2-A1). لوبول ها شامل لوله های سمی فروس و بافت بینابینی لوله ها که خود حاوی سلول های اندوکرینی لیدیگ هستند. لوله های سمی فروس لوب های پیچ خورده هستند (شکل 2-B1). مایعات از طریق لوله های سمی فروس ترشح شده در rete جمع آوری می شوند و از طریق سیستم مجاری بیرون دهنده اپی دیدیم منتقل می شوند (6).



شکل (1). (A) مقطع عرضی از بیضه انسان. (B) آرایش لوله های سمی فروس در بیضه انسان و از سیستم بیرون ریزنده (ductular) از اپی دیدیم. نقاشی نیمه شماتیک (10).

## ساختار لوله سمی فروس :

لوله سمی فروس شامل اپی تلیوم ژرمینال و بافت اطراف لوله لامینا پروپریا<sup>15</sup> (شکل 2-C1) است (7). میانگین قطر لوله های سمی فروس 180μm، ارتفاع اپیتلیوم ژرمینال 80μm، وضخامت بافت اطراف لوله

<sup>14</sup>. Tunica albuginea

<sup>15</sup>. lamina propria

8 $\mu$ m است. اپی تلیوم ژرمینال شامل مراحل تکاملی مختلفی از ژرم سل ها است که اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه و ثانویه واسپرماتید خوانده می شوند. این سلول ها در لابه لا وپیچ خوردگی سلول های سرتولی قرار می گیرند (6). سلول های سرتولی منشوری توسط نواحیه ی ویژه ی اتصالات محکم<sup>16</sup> از غشاء سلولی به هم متصل هستند که اپی تلیوم ژرمینال را به قسمت های پایه و adluminal جدا کرده اند. در طول بلوغ سلولهای جنسی از این مرز عبور کرده وارد قسمت adluminal می شوند. در سلول های سرتولی، افزایش مقدار قطرات لیپیدی در ارتباط با شروع افزایش سن یک شاخصی از "ساعت بیولوژیکی" در بیضه ها است (5). عملکردهای دیگری نیز به سلول های سرتولی نسبت داده شده (6):

1. عملکردهای حمایتی و تغذیه ای برای سلولهای جنسی
2. سازماندهی در انتقال اسپرماتیدهای بالغ به لومن لوله ها<sup>17</sup>
3. تولید مواد اندوکرینی وپاراکرینی برای تنظیم اسپرماتوژنز
4. ترشح پروتئین متصل شونده آندروژن (ABP)<sup>18</sup> برای نگهداری از اپیتلیال سیستم مجرای بیرون دهنده
5. برهم کنش با سلول های لیدیگ اندوکرینی ما بین لوله ای.

## اسپرماتوژنز<sup>19</sup>:

اسپرماتوژنز فرایندی پیچیده است، وابسته به جمعیت سلولهای جنسی که اسپرماتوزوا را تولید می کنند. اسپرماتوژنز پس از یک دوره طولانی مقدماتی "prespermatogenesis" در دوران جنینی و نوزادی، در هنگام بلوغ آغاز می شود. سه مرحله عمده را می توان تشخیص داد: اسپرماتوگونیوژنز، بلوغ اسپرماتوسیت

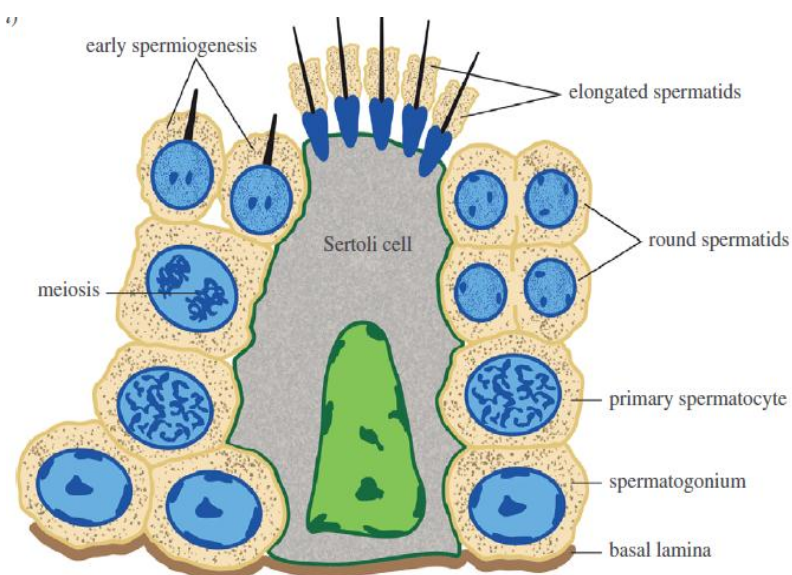
<sup>16</sup> .Tight Junction

<sup>17</sup> . Spermiation

<sup>18</sup> . Androgen Binding Protein

<sup>19</sup> .Spermatogenesis

و اسپرمیوژنز که تمایز سیتوپلاسمی اسپرماتیدهاست شکل (2-2) (6).



شکل (2). لوله سمی فروس که نشان دهنده ژرم سل های در حال تکامل در داخل سلول سرتولی اسپرماتوگونی تحت تقسیم میتوز قرار می گیرند، و در نهایت تبدیل به اسپرماتوسیت میوزی می شود (121).

## اسپرماتوگونیوژنز<sup>۲۰</sup>:

انواع مختلفی از اسپرماتوگونی توسط موقعیت خود در بخش پایه ای از اپیتلیوم ژرمینال، با توانایی رنگ پذیری هسته قابل تشخیص هستند:

(1) نوع A کم رنگ اسپرماتوگونی<sup>۲۱</sup>

(2) نوع A تیره اسپرماتوگونی<sup>۲۲</sup>

(3) نوع B اسپرماتوگونی<sup>۲۳</sup>

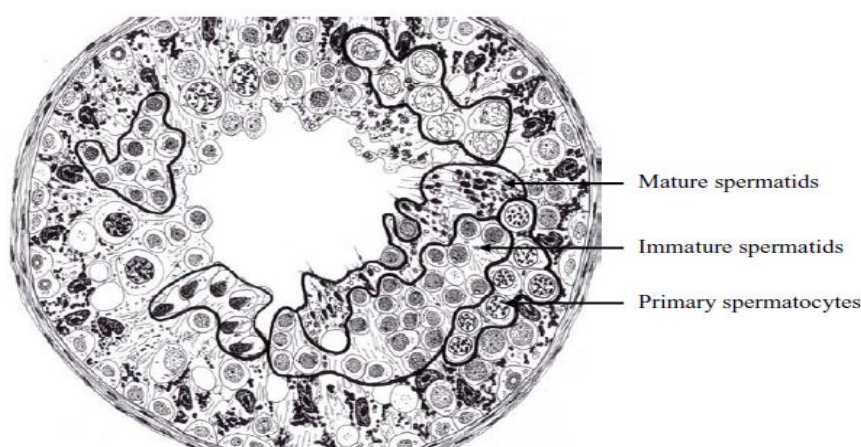
<sup>20</sup> . Spermatogoniogenesis

<sup>21</sup> . A pale type- spermatogonia

<sup>22</sup> .A pale type- spermatogonia

<sup>23</sup> .B type-spermatogonia

نوع A اسپرماتوگونی متعلق به ذخیره سلول های بنیادی است. نوع B- اسپرماتوگونی نشان دهنده شروع تکامل سلولهای جنسی به سمت اسپرماتیدها است(6). اسپرماتوگونی ها چندین نسخه متوالی از تقسیمات پی در پی میتوز دارند. تقسیمات سلول های اسپرماتوگونی معمولا ناقص هستند. سلول های دختری از طریق پل های سیتوپلاسمیک به هم متصل باقی مانده، بنابراین یک کلون مشتق از یک سلول بنیادی شکل می گیرد که چندین هسته دارد. گمان بر این است که تشکیل این کلون ها اساس تکامل هماهنگ سلولهای جنسی است (شکل 2-3) (6).



شکل (3). لوله های سمنی فروس با کلون مشخص از سلول های زایا.  $\times 300$  (6).

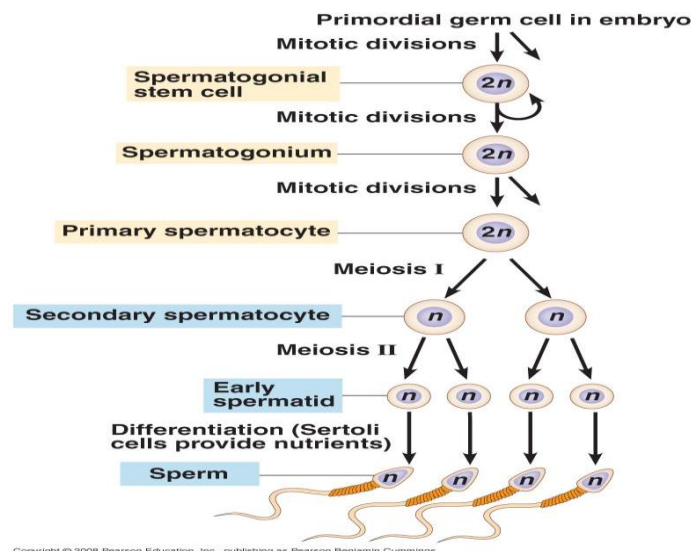
هر دو نوع اسپرماتوگونی A برای اسپرماتوژنز صحیح ضروری هستند. در زمان کاهش اسپرماتوژنز نوع A تیره اسپرماتوگونی اغلب وجود ندارند. البته، در صورت عدم وجود هر دو نوع سلول های اسپرماتوگونی، هیچ اسپرماتوژنزی انجام نمی شود و اپی تلیوم ژرمینال فقط حاوی سلول های سرتولی خواهد بود. اسپرماتوگونی ها ممکن است از زمان تولد غایب باشند<sup>24</sup> و یا ممکن است به وسیله توکسیک های مختلف تخریب شده باشند، مانند پرتو-X (سندرم SCO مادرزادی)<sup>25</sup>.

<sup>24</sup> . Congenital Sertoli cell-only Syndrome

<sup>25</sup> . Syndrom acquired Sertoli cell-only

## تقسیم میوز اسپرماتوسیت<sup>۲۶</sup>:

مرحله تقسیم میوز بواسطه تغییر در شکل کروماتین هسته بعد از آخرین تقسیم در اسپرماتوگونی مشخص می گردد. سلول ها در تقسیم میوز اسپرماتوسیت نامیده می شوند. فرایند تقسیم میوز شامل دو تقسیم است سلول های قبل از تقسیم اول میوز اسپرماتوسیت اولیه و سلولهای ها قبل از تقسیم دوم میوز اسپرماتوسیت ثانویه نامیده می شوند (شکل 2-4). اسپرماتوسیت های اولیه بزرگترین ژرم سل های اپی تلیوم ژرمینال هستند. تقسیم میوز اسپرماتوسیت ها با مرحله لپتوتن از پروفاز آغاز می شود. بعد از عبور از سد سلول های سرتولی، مرحله اولیه تقسیم سلولی ادامه یافته و با نام های زیگوتن، پاکیتن، دیپلوتن شناخته می شوند. در طی مرحله اولیه تقسیم سلولی همانندسازی DNA، متراکم شدن کروموزوم، جفت شدن کروموزوم های همولوگ و کراسینگ اور اتفاق می افتد. بعد از تقسیم سلولهای جنسی، اسپرماتوسیت های ثانویه ایجاد می شوند و به سرعت به اسپرماتیدها تقسیم می شوند. اینها به اسپرماتیدها بالغ تمایز می یابند (6).



شکل (4). " ازهر اسپرماتوسیت اولیه 46 کروموزومی حاصل از تقسیم میتوز، در اثر تقسیم میوز 1 دو سلول اسپرماتوسیت ثانویه 23 کروموزومی و بعد از تقسیم میوز II، چهار سلول هاپلوئید اسپرماتید بوجود می آید " (8).

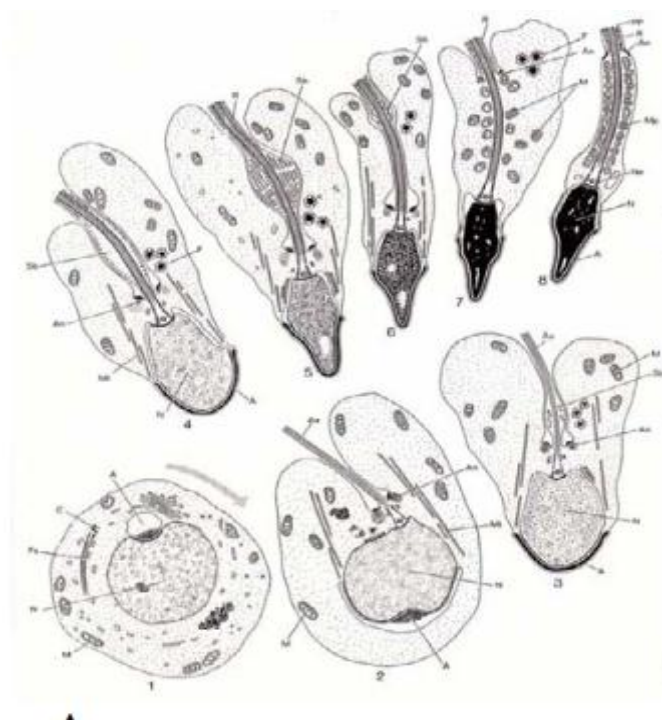
<sup>26</sup>. Meiosis of spermatocytes

## اسپرمیوژنز :

در طول تمایز سیتوپلاسم اسپرماتید ها سه فرایند اتفاق می افتد (شکل 2-5).

- تراکم کروماتین هسته در حدود یک دهم حجم اسپرماتید نابالغ
- تشکیل cap آکروزوم پر شده از آنزیم توسط دستگاه گلژی و اتصال آن به هسته
- تکامل ساختار فلاژل و جاگیری آن در هسته

در اسپرماتید های تکامل یافته وضعیتی که آنها را قادر می سازد تا در طی یک فرایند پیچیده اپیتلیوم ژرمینال را ترک کنند، اسپرمیشن نامیده می شود (6). به طور خلاصه، تمایز اسپرماتیدها به هشت مرحله تقسیم می شود که در شکل نمایش داده شده (شکل 2-5) (10).



شکل (5). مراحل تمایز اسپرماتید: (مرحله 1) اسپرماتید نابالغ با هسته گرد. وزیکول آکروزوم به هسته متصل می شود، زائده دم در تماس با هسته موفق نیست. (مرحله 2) کیسه آکروزوم بر روی هسته افزایش یافته و مسطح می شود. دم به هسته متصل می شود. (مرحله 3-8) آکروزوم شکل گرفته، هسته متراکم شده و تکامل ساختار دم اتفاق می افتد. (مرحله 8) اسپرماتید بالغ از اپیتلیوم ژرمینال آزاد می شود. طراحی بر اساس میکروگراف الکترونی (9).



## اسپرمیشن<sup>۲۷</sup> :

انتقال اسپرماتیدهای بالغ از اپی تلیوم ژرمینال توسط سلول های سرتولی مدیریت می شود. در نتیجه ی یک مشارکت پیچیده از میانجی گری فیلامنت ها و لوله های سیتوپلاسمیک سلولهای سرتولی، اسپرماتیدها به مرز لومن لوله های سمنی فروس پیشرفت می کنند (6). اسپرماتیدهای بالغ نزدیک پل های مابین سلولی قراردادارند ، تماس آنها با اپی تلیوم ژرمینال قطع شده و سلول ها آزاد می شوند، اکنون آنها اسپرماتوزوا نامیده می شوند (11).

مشخصات اسپرماتوزنز طبیعی بر اساس برش های هیستولوژیکی (6) :

- حداقل قطر لوله های سمنی فروس  $180\mu\text{m}$
  - حضور انواع A dark ، A pale ، B اسپرماتوگونی
  - حضور اسپرماتوسیت های اولیه و ثانویه
  - تمایز اسپرماتیدها
  - منطقه اسپرمیشن
  - حداقل امتیاز 8 در ارزیابی اسپرماتوزنز
  - لومن لوله های سمنی فروس
  - توزیع نرمال لیپید در سیتوپلاسم سلول های سرتولی
  - حضور مراحل مختلف اسپرماتوگونی
  - تشکیل کلونی هایی از ژرم سل ها
  - حداکثر ضخامت  $8\mu\text{m}$  برای lamina propria در لوله های سمنی فروس
- ساختار طبیعی و توزیع سلول های لیدیگ

---

<sup>27</sup> . Spermiation

## سینتیک اسپرماتوژنز<sup>۲۸</sup> :

اسپرماتوژنز در طی دوران بلوغ آغاز می شود و در سراسر طول زندگی و تا سن پیری ، به علت ذخیره سلول های بنیادی پایدار ادامه دار است. سلول های جنسی بیشماری تکامل یافته و از طریق لوله های سمی فروس منتقل می شوند. روند اسپرماتوژنز بشدت سازمان یافته است : اسپرماتوگونی ها دائماً تقسیم می شوند، قسمتی به صورت اسپرماتوگونی باقی می ماند و قسمتی وارد اسپرماتوژنز می شوند. گروه های سلولی منشاء گرفته از تقسیم اسپرماتوگونی، از قسمت پایه ای به قسمت adluminal اپی تلیوم ژرمینال مهاجرت می کنند. گروه های سلولی با تکامل متفاوت در برش های سمی فروس در برش هایی از لوله های سمی فروس دیده می شوند و در مشارکت با ویژگی عمومی اپی تلیوم ژرمینال هستند. در هر منطقه باتوجه به اپی تلیوم ژرمینال هر 16 روز ویژگی عمومی همان گروه ژرم سل ظاهر می شود. این دوره زمانی " چرخه اپی تلیوم سمی فروس<sup>۲۹</sup> " نامیده می شود (12). تکامل نوع A- اسپرماتوگونی به اسپرماتید بالغ چهار تا شش چرخه ، 74 روز نیاز دارد. انتقال اسپرماتید بالغ از اپی تلیوم ژرمینال به عنوان اسپرماتوزوا از طریق سیستم مجرای اپیدیدیم در طی 12 روز اضافی دیگر انجام می شود. بنابراین، 86 روز حداقل زمان محاسبه شده برای یک چرخه کامل اسپرماتوژنز از اسپرماتوگونی تا اسپرماتوزوا بالغ است (6).

## محصولات اسپرماتوژنز: اسپرماتوزوا

اسپرماتوزوا ها با شکل منحصر به فرد برای انتقال به گامت مونث مناسب هستند. برای این منظور، هسته اسپرماتوزوا متراکم می شود ، برای برقراری تماس با گامت زن با یک آکروزوم پوشش داده می شود و برای حرکت پیش رونده به یک فلاژل متصل می شود. قطر سر اسپرماتوزوا 4-5 $\mu$ m است ، قطر فلاژل 1-2 $\mu$ m و طول اسپرماتوزوا 60 $\mu$ m است (10).

---

<sup>28</sup> . Kinetics of spermatogenesis

<sup>29</sup> . cycle of the seminiferous epithelium

## کارایی در روند اسپرماتوژنز<sup>۳۰</sup>:

سلولهای جنسی در طول اسپرماتوژنز از دست می روند و تعداد اسپرماتوزوای بدشکل در مایع انزالی بشدت افزایش می یابند. ظرفیت بالقوه اسپرماتوژنز 100٪ محاسبه شده، که 75٪ از سلولهای جنسی تکامل یافته توسط آپوپتوز و یا تخریب از دست می روند. فقط 25٪ از سلولهای جنسی به مایع انزالی می رسند که بیش از نیمی از آنها بدشکل هستند. بنابراین، فقط 12٪ از پتانسیل اسپرماتوژنز برای تولید مثل در دسترس است (6). در مقایسه با حیوانات آزمایشگاهی بازده اسپرماتوژنز در انسان به نظر ناچیز است. در این رابطه یکی از معیارهای مورد توجه میانگین نسبت اسپرماتیدهای کشیده به سلول های سرتولی 3 تا 4 در اپی تلیوم ژرمینال انسان درمقابل 12 در رت ها است (13). براساس این محاسبات تعداد زیادی از اسپرماتوزوها را باید در مایع انزالی نسبت به مقدار کمتر از 20 میلیون اسپرماتوزوایی در هر میلی لیتر از مایع انزالی انتظار داشت، همانگونه که در کتابچه WHO به عنوان مقدار نرمال پیشنهاد شده است (14).

## اختلال اسپرماتوژنز<sup>۳۱</sup>:

تکثیر و تمایز سلولهای جنسی و مکانیسم های تنظیمی داخل وخارج بیضه ای در هر مرحله می تواند مختل شود (9). این ممکن است در نتیجه تاثیرات محیطی ویا به سبب بیماری های که به طور مستقیم ویا غیر مستقیم براسپرماتوژنز تاثیر بگذارد. علاوه بر این، مواد مغذی مختلف، داروها، هورمون ها و متابولیت های شان، مواد مختلف سمی یا تابش پرتو X سبب کاهش ویا تخریب اسپرماتوژنز شوند. سرانجام یک ماده سمی نسبتا ساده منجر به افزایش درجه حرارت می شود که فعالیت اسپرماتوژنز را در بیضه ها کاهش می دهد (6).

---

<sup>30</sup>. Efficiency of spermatogenesis

<sup>31</sup>. Disturbances of spermatogenesis

## محاسبه امتیازات برای ارزیابی اسپرماتوژنز (15):

- 10- اسپرماتوژنز سالم و دست نخورده: بسیاری از اسپرماتید های بالغ و مناطق spermiation
- 9 - اسپرماتوژنز نسبتاً کم: کاهش تعداد اسپرم بالغ، تعداد کمی مناطق spermiation
- 8 - کاهش متمایز اسپرماتوژنز: تعداد کمی اسپرماتید های بالغ، بدون spermiation
- 7 - اسپرماتوژنز، بطور قابل توجهی کاهش می یابد: بدون اسپرماتید بالغ، فقط اسپرماتید نابالغ، بدون spermiation
- 6 - اسپرماتوژنز به شدت کاهش می یابد: فقط تعداد کمی اسپرماتید نابالغ، کاهش ارتفاع اپی تلیوم ژرمینال
- 5 - توقف روند اسپرماتوژنز در مرحله اسپرماتوسیت اولیه: بسیاری از اسپرماتوسیتها در مرز لومن لوله های سمنی فروس
- 4 - توقف روند اسپرماتوژنز در مرحله اسپرماتوسیت اولیه: تعداد کمی اسپرماتوسیت اولیه حضور دارند
- 3 - توقف در مرحله اسپرماتوگونی: نوع A اسپرماتوگونی چندین نسخه دارند اما به سمت سلولهای بالغ اسپرماتوژنز تکامل نمی یابند.
- 2 - بدون سلولهای زایای، فقط سلول های رده سرتولی حضور دارند
- 1 - بدون سلولهای ژرمینال، بدون سلول های رده سرتولی. لوله های سمنی فروس توسط بافت همبند ماده زمینه ای جایگزین می شوند.

## درک روند اسپرماتوژنز از جنبه های کمک تولید مثلی :

امروزه روش های موجود کمک تولید مثلی در دانش پایه اسپرماتوژنز بنیان نهاده شده اند. با استفاده از تکنیک های تخصصی از استخراج اسپرم از بافت بیضه (TESE)<sup>32</sup> در ترکیب با تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI)<sup>33</sup> حاملگی را می تواند القاء کند. حتی در موارد نامطلوب ناباروری مردان (آزواسپرمی در انزال، سطوح بالای FSH<sup>34</sup>) در بیش از 50٪ ICSI گامت نر سازگار را می توان شناسایی و برای لقاح مورد استفاده قرار داد (16).

## عوامل دخیل در اسپرماتوژنز ناقص :

ناباروری با علل مردانه یک اختلال پیچیده ای است که بخش بزرگی از جمعیت را تحت تاثیر قرار داده است، با این حال، بسیاری از علل آن ناشناخته است. روشن کردن اساس ژنتیکی زمینه ای فنوتیپ نابارور، ممکن است به کشف علل ناباروری و کمک به درمان موثر برای بیماران منجر شود (17). اما در یک دسته بندی کلی می توان دلایل نقص در اسپرماتوژنز را در سه گروه تقسیم کرد :

- (1) عوامل اکتسابی<sup>35</sup>
- (2) عوامل مادرزادی<sup>36</sup>
- (3) عوامل ناشناخته<sup>37</sup>

---

<sup>32</sup> . Testicular Sperm Extraction

<sup>33</sup> . Intra-Cytoplasmic Sperm Injection

<sup>34</sup> . Follicle-stimulating Hormone

<sup>35</sup> . Acquired Infertility

<sup>36</sup> . Congenital Infertility

<sup>37</sup> . Idiopathic

## عوامل اکتسابی :

از جمله عوامل مهمی که در این دسته قرار می گیرند شامل : عفونت و التهاب، فاکتورهای ایمنولوژیک ، جراحی و آسیب های ناشی از جراحی اندام های تولید مثل، مواد شیمیایی و قرارگرفتن در معرض تشعشع (18).

## عفونت و التهاب :

فرآیندهای عفونی ممکن است منجر به بدتر شدن اسپرماتوژنز، اختلال عملکرد اسپرم و یا انسداد مجاری منی شوند (19). گاهی اوقات ابتلا به برخی از عفونت ها می تواند سبب تشکیل آنتی بادی های خودی بر علیه اسپرم شود (20).

## فاکتور های ایمنولوژیک :

آنتی اسپرم آنتی بادی<sup>38</sup> به عنوان یک ایمنوگلوبولین با فعالیت آنتی بادی علیه آنتی ژن اسپرم است که در ناباروری نقش ایفاء می کند. ASA ممکن است جزء اتو آنتی بادی های طبیعی باشد (21).

جراحی و آسیب های ناشی از جراحی دستگاه تناسلی :

مداخلات هرینوپلاستی<sup>39</sup> کشاله ران که اغلب در شیرخوارگی انجام می شود ممکن است موجب آسیب دیدن لوله ها شده و سپس شرایط انسداد مجاری منی را ایجاد کند (22).

---

<sup>38</sup> .Antisperm antibody

<sup>39</sup> .Herinoplasty

## مواد سمی :

درمان دارویی و پرتودرمانی برای تومورها معمولاً باعث آسیب غیر قابل برگشت به اسپرماتوژنزی می شوند. حتی هورمون درمانی با دوز بالا، درمان آنتی بیوتیکی با : تتراسایکلین، سولفاسالازین؛ اغلب به طور موقت روند اسپرماتوژن را تغییر می دهند(22).

## علل مادرزادی :

### واریکوسل :

یکی دیگر از علل شایع ناباروری مردان واریکوسل است. علت واریکوسل به طور کامل روشن نیست. اثر نامطلوب واریکوسل بر روی اسپرماتوژن را می توان به عوامل بسیاری از جمله افزایش دمای بیضه افزایش فشار داخل بیضه ، هیپوکسی به علت تضعیف جریان خون، ریفلاکس معده و متابولیت های سمی از غدد آدرنال و اختلالات هورمونی نسبت داد (23).

## ناهنجاری های اندوکرین :

تمام مردان مبتلا به هیپوگنادیسم هایپوگنادوتروپیک باید برای مشاوره ژنتیک مراجعه کنند، تقریباً تمام ناهنجاری های مادرزادی هیپوتالاموس به علت یک تغییر ژنتیکی می باشد(22). یکی دیگر از نتایج احتمالی جهش در ژن گیرنده آندروژن سندرم Kennedy است. یک اختلال عصبی است که اختلال در اسپرماتوژن مشخصه آن است. سندروم Kallmann در نتیجه جهش در ژن KAL1 است، و با نقص در ترشح هورمون GnRH از هیپوتالاموس شناسایی می شود (17).

## عوامل ژنتیکی :

ناهنجاری های ژنتیکی 15٪ تا 30٪ از فاکتورهای مردانه ناباروری را شامل می شوند (24). فاکتورهای ژنتیکی با تاثیر بر روند های گوناگون فیزیولوژیکی نظیر هموستاز هورمون، اسپرماتوژنز، کیفیت اسپرم ها در ناباروری مداخله می کنند (17). ناهنجاری های کروموزومی تقریباً 6 درصد از تمام مردان نابارور را شامل می شود. فاکتور های ژنتیکی نقش مهمی را در آواسپرمی غیر انسدادی بازی می کنند. دو طبقه بندی عمومی از فاکتور های ژنتیکی مرتبط با آواسپرمی غیر انسدادی وجود دارد (22) :

(1) ناهنجاری کروموزومی که منجر به عملکرد ناقص بیضه ها می شود.

(2) Microdeletion های کروموزوم Y که منجر به اسپرماتوژنز ناقص می شود.

## ناهنجاری های کروموزومی :

آنیوپلویدی<sup>40</sup>، رایج ترین خطا ناشی از ناهنجاری های کروموزومی در مردان نابارور است. مردان با مشکل آواسپرمی غیر انسدادی شیوع بالای آنیوپلویدی، به خصوص در کروموزوم های جنسی خود را دارند. نشانگان کلاین فیلتر، شایع ترین ناهنجاری کروموزومی ناشی از آنیوپلویدی، با شیوع 5٪ در مردان با اولیگواسپرمی شدید و 10٪ در مردان آواسپرم است. سندرم معمولاً باعث توقف اسپرماتوژنز در مرحله اسپرماتوسیت اولیه<sup>41</sup> می شود، اما گاهی اوقات مراحل بعدی از تکامل اسپرم مشاهده می شوند. بیماران مبتلا به سندرم کلاین فیلتر ممکن است برای بچه دار شدن از روش ICSI استفاده کنند، اما آنها در معرض خطر تولید فرزندان با ناهنجاری های کروموزومی اند. توصیه می شود که تشخیص ژنتیکی پیش از لانه

---

<sup>40</sup> . Aneuploidy

<sup>41</sup> . Primary spermatocyte



گزینی (PGD) قبل از ART<sup>42</sup> انجام شود تا از این که فرزندان آنیوپلویدی نباشند، اطمینان حاصل

شود (17). جابجایی کروموزومی<sup>43</sup> یک منشاء دیگری برای آنیوپلویدی است. جابجایی های اتوزومی 4 تا

10 برابر بیشتر احتمال دارد در مردان نابارور در مقایسه با مردان سالم پیدا شود. جابجایی رابرتسونین<sup>44</sup>،

شایع ترین ناهنجاری ساختاری کروموزومی در بدن انسان است که باروری در یکی از 1000 مرد را تحت

تاثیر قرار می دهد. جابجایی رابرتسونین در مردان آزواسپرم و اولیگواسپرمی، با نرخ 1.6٪ و 0.09٪ شایع

تر هستند (17). جهش ژن های اتوزومی :

بسیاری از ژن های اتوزومی مانند FSH2, LH, YBX2, AR, CFTR,... نیز برای نقش احتمالی

در ناباروری با علل مردانه بررسی شده است. ژن CFTR<sup>45</sup>، بر روی کروموزوم 7 قرار دارد، در 60٪-90٪ از

بیماران مبتلا به فقدان مادرزادی دو طرفه مجرای دفران جهش یافته است. تکنیک ICSI روش مفیدی برای

درمان مردانی با جهش CFTR است به شرطی که زن جهش CFTR را حمل نکند. در این تحقیق ما بر

روی پلی مورفیسم های ژن YBX2 تمرکز نمودیم (17).

## کروموزوم Y و ژن های دخیل در ناباروری :

کروموزوم Y یک منطقه دارای پتانسیل زیاد به منظور مطالعه ناباروری با علل مردانه است، زیرا حاوی

بسیاری از ژن هایی است که برای روند اسپرماتوژنز و تکامل غدد جنسی مردانه هم بسیار مهم هستند (25)

یک منطقه خاص مورد علاقه در Yq منطقه فاکتور آزواسپرمی<sup>46</sup> است، که حاوی ژن های دخیل در رشد

---

<sup>42</sup> . Assisted Reproductive Technology

<sup>43</sup> . Translocation

<sup>44</sup> . Robertsonian Translocation

<sup>45</sup> . Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator

<sup>46</sup> . Azoospermia Factor

و تکامل اسپرم است. منطقه AZF شامل سه ناحیه : AZFa ، AZFb و AZFc است. حذف های ژن های متعدد از مناطق AZFb و AZFc می تواند طیف گسترده ای از فنوتیپ نابارور را ایجاد کنند (25).

## پروتئین Y-box2 موشی :

پروتئینهای Y-box در اصل به عنوان پروتئینهای متصل شونده به DNA هستند که با استفاده از دامین حفظ شده cold shock در ارتباط با توالی مورد توافق Y-box در DNA می باشند (26). بعداً، مشخص شد که این پروتئین پروتئین متصل شونده به RNA نیز می باشد که برای اولین بار در تعامل با mRNA هایی که در هسته رونویسی می شوند شناسائی شد. بسیاری از پروتئین های Y-box با mRNA به سیتوپلاسم حرکت می کنند، جاییکه آنها سرنوشت خود را تنظیم می کنند (27). یکی از بهترین موارد مورد مطالعه قرار گرفته پروتئین های Y-box، FRGY2 ها می باشند که دارای سطح زیادی در سیتوپلاسم اووسیت، *Xenopus laevis* هستند، جاییکه در آن با عملکرد خود mRNA های مادری رامسدود می کنند (28). MSY2 موش، که در اصل به موجب توالی یکسان آن با FRGY2 مشخص شد (29)، و به طور اختصاصی در سلولهای جنسی موش های مذکر و مونث بیان می شود (30). برای روشن کردن نقش عملکردی MSY2 در سلول های زایا، Yang و همکاران (2005) موش های نول MSY2 را ایجاد کردند (31). آنها دریافتند که موش های نر جهش یافته تعداد غیر طبیعی بالایی از آپوپتوز اسپرماتوسیت میوزدارند، که منجر به از دست رفتن زیادی از مرحله 8/9 اسپرماتیدها، و همچنین باعث ایجاد اسپرماتید چند-هسته ای، بدشکل، فقدان اسپرماتوزو در اپی دیدیمیس و در نهایت ناباروری می گردد (32). به طور مشابه، موش های ماده جهش یافته نقص در تخمک گذاری، از دست دادن زودرس تخمک و ناباروری را نشان دادند (31). برای درک نقش مولکولی MSY2 در اسپرماتوزن، Yang و همکاران (2005)، mRNAs هایی که به طور ویژه به وسیله

MSY2 در ژرم سل های مذکر پوشانده می شوند را شناسایی کردند (33). آنها دریافتند که اکثریت MSY2 ها یک توالی موتیف Y-box در ناحیه پروموتور ژن های مربوطه شان را دارند. این نشان می دهد که MSY2 ابتدا این پروموتورهای ویژه را شناسایی می کند، سپس به mRNA های رونویسی شده از این پروموتورها متصل می شود. این کار یک ابزار کار آمد با قدرت انتخاب بالا ایجاد می کند تا بیان ژن را کنترل کنند، و توسط این واقعیت پشتیبانی می شود که MSY2، مانند FRGY2، می تواند به RNA و DNA متصل شود (26) در میان ژن ها، به احتمال زیاد این مکانیسم، بیان ژن های Pmr1 و Tnp2 را کنترل می کند، که هر دو دارای Y-box در پروموتور خود هستند و کاهش بیان شدیدی در بیضه های MSY2- نول نشان می دهند. به دلیل آنکه ژن های Pmr1 و Tnp2 برای سازمان دهی ساختار کروماتین اسپرماتید در طی آخرین مراحل اسپرماتوژنزیستی هستند، فقدان بیان آنها در مرحله آخر اسپرماتیدهای Msy2-null احتمالاً باعث نقص در تراکم هسته می گردد (34). به دلیل آنکه MSY2 با هر دوی RNA و DNA در اندرکنش است و می تواند بطور بالقوه در بسیاری از سطوح مختلف فعالیت کند. Yang و همکاران (2007). نشان دادند که از دست دادن Msy2 تاثیری بر روی رونویسی، اسپلایسینگ mRNA و یا نقل و انتقال داخل سلولی mRNA ندارد ولی در عوض اثر انتخابی بر روی میزان ترجمه دارد (32). به طور ویژه، فقدان ژن Msy2 منجر به انتقال mRNA های محدود به ریبونکلوپروتئین (RNP) به روی پلی زوم ها می شود. این نشان می دهد که MSY2 بطور نرمال ترجمه زیر مجموعه هایی از mRNA های ژرم سل ها را سرکوب می کند. شناسایی سیگنالی که سرکوب ترجمه را آزاد می کند جالب توجه است، که موجب القاء ترجمه ی mRNA های محدود به MSY2 در زمان مناسب در حین تکامل ژرم سل ها می شود. اخیراً، Medvedev و همکاران (2008) نشان دادند که فسفوریلاسیون MSY2 توسط cyclin وابسته کیناز-1 باعث تخریب چند mRNA های ذخیره شده در تخمک شده است. این نکته برای تعیین اینکه آیا ژرم سل های مردانه

مکانیسمی مشابه برای تنظیم ترجمه mRNA های پدری محدود به MSY2 بکار می گیرند، مهم خواهد بود(35).

## ژن Contrin :

ژن Contrin بروی کروموزوم 17p11.2-13.1 واقع شده است، که با نام رسمی Y box binding protein 2 شناخته می شود و ممکن است با نام های DBPC; MSY2; CSDA3; CONTRIN نیز شناخته شود. آنالیز سکانس cDNA ، پروتئین Contrin نشان داد که این یک پروتئین بسیار مشابه همولوگ با پروتئین Y-box ژرم سل موش وزنوپوس با دامین "cold shock" و چهار جزیره آروماتیک بازی می باشد. Contrin به شدت بازی و مملو از آمینواسیدهای آرژینین و پرولین بوده و همچنین حاوی هفت جایگاه فسفوریلاسیون کازئین کیناز 2 و سه جایگاه فسفوریلاسیون پروتئین کیناز C است و این نشان می دهد که Contrin در vivo بشدت فسفریله می باشد. این پروتئین همچنین حاوی دو سیگنال مستقر شونده در هسته (NLS) است که نقش شاتلی را مابین هسته و سیتوپلاسم بازی می کند(36). یکی از مشخصات بارز تغییر و تحول کروماتین در طی اسپرماتوژنز گذار متوالی هیستون متصل به ژنوم در اسپرماتوسیت های اولیه به پروتامین متصل به ژنوم در اسپرماتیدهای کشیده است. لزوم این گذار جدا شدن موقتی رونوشت و ترجمه در اسپرماتید در حال تکامل است و نتیجه ی آن یک تراکم شدید بوده و احتمالاً رونویسی ساختار کروماتین خاموش می شود. از این رو اعتقاد براین است که تنظیم پروتامین به شدت به جدا شدن موقتی رونوشت و ترجمه در اسپرم در حال تکامل وابسته است(37). مکانیسمی که توسط آن عمل سرکوب ترجمه در اسپرماتوژنز صورت می گیرد به طور کامل درک نشده است. حضور ریبونوکلوپروتئین<sup>47</sup>، کمپلکس پروتئین

---

<sup>47</sup>.Messenger ribonucleoproteins (mRNP<sub>s</sub>)

های متصل به RNA<sup>48</sup> و mRNA در اسپرمتاید های گرد و کشیده واضح است. RBPs فسفریله شده متصل به mRNAs با سکانس کوچک ویژه در همکاری با mRNPs منجر به مهار ترجمه می شود. تغییر و تحول کمپلکس های mRNP باعث رها شدن mRNA های قابل ترجمه و از سر گرفتن سنتز پروتئین ها می گردد (37).

در مطالعات Hammoud و همکاران (2009) تغییرات ژنی Contrin در 288 مرد مبتلا به نقص شدید در روند اسپرمتوژنز از جمله آزو اسپرمی، اولیگواسپرمی شدید، و نمونه های با کمبود بررسی شده است. نتایج آنها پانزده جایگاه پلی مورفیسم را آشکار کرده اند. هفت پلی مورفیسم در یک فرکانس آماری بالاتری در بیماران مبتلا به ناباروری حضور داشتند، به خصوص در مردان با بیان غیر طبیعی پروتامین. از تعداد هفت جایگاه، دو جایگاه منجر به جایگزینی اسید آمینه در دامین shock cold حفاظت شده می شود. یکی منجر به تغییر {کدون} مترادف بسیار قابل توجه در اگزون 8 از بیماران نابارور می شود. فراوانی پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی در بیماران مبتلا به ناباروری بطور قابل توجهی بالا بود، به خصوص در مردان با بیان غیر طبیعی پروتامین. در این مطالعات نویسندگان نشان دادند که Contrin نقش بالقوه در روند اسپرمتوژنز مرد دارد، و این تغییرات ژنی به عنوان یک علت بالقوه ناباروری با علل مردانه است (37).

در مطالعه قبلی بیان این طرح فراوانی 3 پلی مورفیسم rs 8069533 ، rs 222859 ، rs 768015399 مورد مطالعه قرار گرفت نتایج نشان دادند که فراوانی ژنوتیپ TT در پلی مورفیسم rs 222859 در مردان آزو اسپرم به طور معنی داری بیشتر از مردان گروه کنترل می باشد. در این تحقیق به منظور بررسی میزان تاثیر این پلی مورفیسم بر بیان ژن، میزان بیان ژن YBX2 نمونه بافت بیضه و خون مردان آزو اسپرم دارای پلی مورفیسم و بدون پلی مورفیسم مورد بررسی قرار گرفت.

---

<sup>48</sup>.RNA-binding proteins (RBP)

## فصل دوم

### مرور و بررسی متون

ناباروری مردان شامل 50٪ از ناباروریها میباشد، که حدود 50 درصد از مردان نابارور یا علت ناشناخته دارند و یا ایدیوپاتیک می باشد؛ در این شرایط علتی نمی توان مشخص کرد (37) و (38). یکی از علل اصلی ناباروری در مردان عوامل ژنتیکی می باشد که شامل اختلال در اسپرماتوژنز است (39). ریزحذف Yq و ناهنجاری کروموزومی دو علت اصلی اختلال اسپرماتوژنز است (40). علاوه بر آنها، جهش ژنهای اتوزوم، نیز به ناباروری مردان مربوط می شود. با این حال، مکانیسمهای ملکولی زمینه ساز هنوز هم ناشناخته است (39) و (41) در طول اسپرمیوژنز، PRMS به صورت گام به گام جایگزین هیستون سوماتیک میشود، و باعث بسته بندی DNA در اسپرمی که در سلول های سوماتیک یافت شده می شود (42). روشن است که تنظیم اختلاط پروتامین در کروماتین مربوط به عدم هم زمانی رونویسی و ترجمه است (43). در این راستا، برخی از mRNA messenger ribonucleoprotein (mRNPs) معرفی شد که در گرد و دراز شدن اسپرماتید تاثیر دارد (44). این mRNPs به mRNA پروتامین باند می شوند و ترجمه را مهار میکنند. این ژن در کروموزوم YBX2 p13.117 است. که یک همولوگ انسانی Xenopus DNA/RNA-binding and mouse MSY2 proteins (45) و (46).

برخی از مطالعات در مدل های حیوانی نشان داد، این پروتئین به وفور در بافت بیضه وجود دارد و در سلول های زایا میوز و ارسال میوز را بیان می کند (45) و (46).

یکی از مهمترین خصوصیت های remodeling کروماتین جایگزینی پروتامین به جای هیستون در مرحله اسپرماتید طولی می باشد (47-50). این جایگزینی نیاز به بیان مکرر DNA و mRNA در اسپرماتید در حال تغییر دارد (51-53). این امر باعث به وجود آمدن کروماتین فشرده و تا حدی خاموش از لحاظ بیان ژنها می گردد (48). بنابراین اعتقاد بر این است که جایگزینی پروتامین در ساختار کروماتین نیاز به بیان غیر همزمان در سطح mRNA, DNA دارد (54). مکانیسم دقیق تنظیم بیان ژن در مرحله فشرده شدن کروماتین

هنوز مشخص نمی باشد. ولی نشان داده شده است که ribonucleoprotein (mRNAP) و کمپلکس mRNA و پروتئینهای متصل شونده به آن در این امر نقش عمده های داشته و در اسپرماتید گرد و طویل به وفور دیده شده اند (44). پروتئین متصل شونده به mRNA هنگامی که به mRNA متصل می گردد به صورت فسفریله است و دفسفریلاسیون آن باعث می گردد که mRNA ای باید ترجمه گردد رها شده و ترجمه شود (55) و (56).

تعدادی از پروتئینهای متصل شونده به mRNA در سلولهای جنسی موش و همولوگ آن در انسان شناخته شده است (57-59) یکی از خانواده های پروتئین های متصل شونده به mRNA خانواده پروتئینهای Y-box می باشند که در موش تحت عنوان MSY1, MSY2, MSY4 می باشند (60-62) و (33). MSY2 یکی از مهمترین پروتئینهای متصل شونده به mRNA, DNA می باشد که 0.7 پروتئینهای اسپرماتید را تشکیل می دهد (63). در بیضه موش بیشترین میزان بیان ژن MSY2 در اسپرماتید گرد می باشد و نقش پایدار کننده mRNA را دارد (64). این پروتئین همچنین نقش فاکتور رونویس را ایفا می نماید به دلیل اینکه در سلولهای جنسی به توالی Y-box ژن پروتامین 2 متصل شده و در تنظیم بیان آن نقش دارد (65) و (33).

همچنین مطالعات نشان داده اند که این پروتئین به عنوان یک shuttle عمل می نماید و در انتقال mRNA از هسته اسپرماتید به سیتوپلاسم نقش دارد (32 و 63 و 66). مطالعاتی که روی موش Knockout انجام گرفته نشان داده است که این موشها از لحاظ فنوتیپی به صورت نرمال هستند ولی نابارور می باشند (32). در این موشها اسپرماتوژنیزس در مرحله بعد از میوز متوقف گشته و اسپرماتیدها به صورت آتروفه و چند هسته ای بوده و اسپرماتوژوا در اپیدیدیم مشاهده نمی گردد (66). جایگزینی پروتامین در اسپرماتیدهای بالغ در این موشها هنوز گزارش نشده است ولی به احتمال زیاد تحت تاثیر قرار می گیرد به دلیل اینکه بررسی اسپرماتیدها نشان داده است که در این موشها اسپرماتیدها در مرحله گرد باقی مانده و به صورت



طویل در نمی آیند که در این امر پروتئین نقش عمده های دارد. مطالعات جدید نشان داده اند که همولوگ انسانی ژن MSY2 در بیضه به میزان زیادی بیان می گردد و YBX2, Contrin نامیده می شود (67). این ژن بر روی کروموزوم 7p11.2 قرار دارد و 6Kb طول داشته دارای 9 اگزون می باشد و 7 رونویس دارد و پروتئینی به طول 364 آمینو اسید کد می کند. در طرح قبلی مجری این طرح کاهش میزان بیان این ژن در بافت بیضه مردان آرواسپرم نشان داده شده است که مقاله مربوطه در حال داوری است و از طرف دیگر در 2 مطالعه در سالهای 2008 و 2009 نتایج توالی یابی این ژن نشان داد که برخی از جهشها به خصوص در اگزونهای 1 و 8 و در نواحی ایترونی به طور معنی داری در مردان نابارور بیشتر از بارور می باشد و این ژن به عنوان یکی از ژنهای مهم دخیل در ناباروری مردان معرفی شده است (68-69). در این تحقیق بر آن شدیم دو تا از پلی مورفیسم های شایع این ژن را در اگزون 1 که به صورت یک ناحیه حفاظت شده است مورد بررسی قرار دهیم.

YBX2 یک پروتئین اختصاصی سلولهای جنسی بوده و قابلیت اتصال به DNA و mRNA دارد. (29) ژن YBX2 را در انسان کلون نمودند و نام آن را Contrin گذاشتند. این محققین عنوان نمودند که این پروتئین 364 آمینو اسید داشته و وزن 38.6 کیلو دالتون دارد و غنی از آرژنین و پرولین می باشد. یک cold-shock domain (CSD) در انتهای N ترمینال داشته ، 7 جایگاه فسفوریلاسیون برای آنزیم کازئین کیناز II و 3 جایگاه فسفوریلاسیون برای آنزیم پروتئین کیناز C دارد. این پروتئین با همولوگ موشی خود 93٪ تشابه آمینو اسید دارد. (29)

با استفاده از تکنیک ایمنو هیستو شیمی نشان دادند که این پروتئین به میزان بالا در اسپرماتوگونی ، اسپرماتوسیت و به صورت معمولی در تروفوبلاست و به میزان کم در ریه ماهیچه و قلب بیان می شود. برعکس بیان کم این ژن در سلولهای سوماتیک در برخی از کارسینوماها بیان زیاد این ژن گزارش شده است. (70)

در چین توالی این ژن را در 210 مرد بارور و 326 مرد نابارور مورد بررسی قرار دادند این گروه 8 ناحیه پلی مورفیک را معرفی کردند. 2 آلل  $c.187T>C$ ,  $c.1095+16A>G$  در مردان نابارور فراوانی بیشتری داشته و در واقع به عنوان یک فاکتور محافظ در برابر اسپرماتوژنز ناقص عمل می نماید. هاپلوتایپ GTCTA دارای 5 نوکلئوتید پلی مورفیک بوده که در مردان نابارور فراوانی بیشتری دارد. (69)

## اهداف و فرضیات (OBJECTIVE & HYPOTHESIS):

### الف- هدف اصلی طرح (General Objective)

بررسی ارتباط پلی مورفیسم rs 222859 ژن YBX2 با میزان بیان آن در نمونه های خون و اسپرم مردان آزوسپرم.

### ب- اهداف فرعی (Specific Objectives):

1- بررسی ارتباط پلی مورفیسم و rs222859 در ژن YBX2 با میزان بیان آن در نمونه خون مردان آزوسپرمیا

2- بررسی ارتباط پلی مورفیسم و rs222859 در ژن YBX2 با میزان بیان آن در نمونه بیضه مردان بارور

### د- فرضیه ها (Hypothesis)

1- آیا پلی مورفیسم rs222859 در ژن YBX2 باعث کاهش میزان بیان آن در نمونه خون و بافت بیضه مردان آزوسپرم می گردد.

# فصل سوم

## مواد و روش کار

این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی قزوین (قزوین، ایران) تصویب شد و بیماران موافقت آگاهانه، خود را اعلام کردند.

تمام نمونه ها در طول سال 2012-2014 از مرکز باروری و ناباروری بیمارستان شریعتی، تهران، ایران جمع آوری شدند.

ما نمونه های خون را از دو گروه، 96 مرد بارور با اسپرم زایی طبیعی، به عنوان نمونه شاهد به دست آوردیم، هیچ یک از مردان بارور سابقه بالینی واریکوسل، کریپتورکیدیسم نداشتند، و همه آنها آنالیز مایع منی طبیعی داشتند. نمونه بیماران مردان مبتلا به آزواسپرمی غیر انسدادی، اولیگواسپرم آستنواسپرم بود. 60. نمونه در گروه مردان آزواسپرم وجود داشت. این افراد قبلاً تشخیصی با هر شرایطی در ارتباط با نازایی نداشتند (به عنوان مثال، فیروز سیستمیک، سندرم کلاین فلتر، واریکوسل، شیمی درمانی، ژن AZF حذف میکرو، و غیره).

برای مطالعه پلی مورفیسم در نمونه بیوپسی بیضه، بافت بیضه از 60 مرد با آزواسپرمی غیرانسدادی، که آنها کاندیدی برای روش استخراج اسپرم از بیضه (TESE) و بافت شناسی بیش از 60٪ از نمونه توقف بلوغ به دست آمد.

در این راستا، نمونه شاهد 12 بیمار مبتلا به آزواسپرمی انسدادی بعد از وازکتومی بودند. بیوپسی ها برای تشخیص دلایل در طول وازکتومی ریورسال انجام شد.

این نمونه برداری اسپرماتوژنز نرمال را نشان داد و به عنوان شاهد انتخاب شدند.

### 3-1. جمعیت مورد مطالعه :

جمعیت مورد مطالعه در این تحقیق شامل 60 نمونه بافت بیضه افراد و نمونه خون آزو اسپرم غیر انسدادی بود که کاندیدای انجام ICSI بودند. متوسط سن این افراد  $31.3 \pm 3.7$  سال بود. از 12 نمونه بافت بیضه افرادی که وازکتومی برگشتی<sup>49</sup> انجام داده بودند با متوسط سن  $35 \pm 2.9$  به عنوان نمونه های کنترل استفاده شد. شایان ذکر است که در این تحقیق افراد دارای واریکوسل<sup>50</sup> و دارای میکرو دلسیون کروموزوم Y از مطالعه حذف شدند و فقط افراد دارای impaired spermatogenesis مورد مطالعه قرار گرفتند. وازکتومی برگشتی یک اصطلاح مورد استفاده برای عمل جراحی است که لوله های اسپرم بر را پس از قطع توسط وازکتومی، دوباره به هم متصل می کنند. نرخ بارداری گزارش شده پس از وازکتومی برگشتی در محدوده 40 تا 90 درصد است. بسیاری از عوامل از جمله نوع وازکتومی انجام شده و تجربه پزشکی که عمل جراحی برگشتی را انجام داده است بر میزان موفقیت آمیز بودن آن تاثیر می گذارد. این مطالعه توسط کمیته اخلاقی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه علوم پزشکی قزوین مورد تایید قرار گرفت. بعد از این که از بیماران رضایت نامه کتبی آگاهانه اخذ شد، بیوپسی بیضه از آنها در بیمارستان شریعتی تهران به دست آمد. اطلاعات مربوط به این افراد نیز از مرکز نازایی دریافت و مورد مطالعه قرار گرفت.

### 3-2. نمونه گیری :

نمونه ها به دو دسته تقسیم می شوند: 60 نمونه آزو اسپرم

1. با پلی مورفیسم rs 222859 شامل :

خون 13

بیضه 13

<sup>49</sup>. Vasectomy reversal (vasovasostomy)

<sup>50</sup>. Varicocele

2. بدون پلی مورفیسم rs 222859 شامل :

خون 47

بیضه 47

### 3-3. انجام تکنیک Real time PCR :

به منظور انجام این تکنیک ، نمونه های بدست آمده فریز شده و به آزمایشگاه مرجع انتقال یافت. از نمونه های مربوطه با استفاده از کیت های استخراج، RNA بدست آمد و با استفاده از کیت سنتز cDNA ، cDNA مورد نیاز ساخته شد. در این مرحله با استفاده از کیت Real time PCR در پلیت های 96 تایی برای هر نمونه (اعم از بیمار و نرمال) 2 تست گذاشته شد (به منظور بررسی میزان بیان 1 ژن هدف و 1 ژن کنترل داخلی).

### 3-3-1. استخراج RNA :

خالص سازی RNA سالم، قدم اولیه بسیاری از تکنیک های زیست شناسی مولکولی، از جمله نورتن بلات واکنش زنجیره ای پلیمرز کمی (qPCR) و روش های microarray است. استخراج RNA به طور معمول با استفاده از روش فاز جامد و یا فنل کلروفرم انجام می شود. مشکل اصلی استخراج RNA، ماهیت در همه جا حاضر RNases است، آنزیم هایی که به سرعت RNA هارا تجزیه می کنند. بسیاری از RNase ها دارای پیوند داخل زنجیره ای دی سولفیدی می باشند که باعث می گردد آنها به خصوص به دنا توراسیون مقاوم باشند. جوشاندن و عوامل دنا توراسیون کننده بر روی فعالیت RNase بی اثر هستند زیرا RNase می تواند به سرعت refold شود و علاوه بر این، بر خلاف DNases، RNases ها برای فعالیت به کاتیونهای دو

ظرفیتی نیازی ندارد. RNase همچنین بر روی پوست حضور دارد، که یکی دیگر از منبع آلودگی بالقوه در سراسر محیط آزمایشگاه است. از بین بردن RNases ممکن است دشوار باشد، هر چند که با مراقبت و مقابله مناسب، استخراج RNA با کیفیت بالا از نمونه های بیولوژیکی مهم قابل دسترسی است. از این رو رعایت برخی از نکات هنگام کار بر روی نمونه های الزامی است (128).

- استخراج RNA در زیر هودآزمایشگاهی
- استریلیزاسیون ابزار مورد استفاده در حرارت بالا
- استفاده از دستکش و تعویض مرتب آن
- استفاده از ماسک دهانی به علت وجود RNase در ذرات آئروسل بزاق
- استفاده از آب DEPC<sup>51</sup> که باعث غیر فعالسازی نوکلئاز ها و تغییر کووالان ریشه های هیستیدین در RNase ها می شود.

#### خالص سازی RNA با استفاده از تکنولوژی RNeasy :

روش RNeasy بیان کننده یک تکنولوژی مورد تایید برای خالص سازی RNA است این تکنولوژی ترکیبی از خواص اتصال انتخابی از یک غشاء بر اساس سیلیکا با سرعت بالا از تکنولوژی microspin است. یک سیستم بافری اختصاصی با نمک بالا اجازه می دهد تا 100 میکروگرم RNA که بیش از 200bp طول دارد به غشاء سیلیکا RNeasy متصل شود. نمونه های بیولوژیکی ابتدا لیز و همورژن شده در حضور بافر حاوی دناچوره کننده گوانیدین تیوسیانات، که بلافاصله RNases را برای اطمینان از خالص سازی RNA سالم غیر فعال می کند. اتانول اضافه شده شرایط اتصال مناسبی را ایجاد می کند و سپس نمونه به ستون RNeasy، که در آن کل RNA ها به غشاء متصل شده و آلاینده ها بطور موثری شسته می شوند. سپس RNA های با کیفیت بالا در 30-100 میکرولیتر آب شستشو می شود (128).

---

<sup>51</sup> . Diethylpyrocarbonate



در این تحقیق نیز از (Qiagene, USA) RNeasy Mini Kit استفاده شد.

مواد و وسایل مورد نیاز :

(1)  $\beta$  مرکاپتواتانول

(2) اتانول 70 %

(3) میکروسانتریفوژ

(4) سمپلر متغیر (از 10 تا 1000 میکرولیتر) (Eppendorf, Germany)

(5) نوک سمپلر زرد و آبی

(6) میکروتیوپ 1/5 میلی لیتری

(7) هموژنایزر (Ultrasonic Processor UP100H)

1- اندازه بافت نباید از 30mg بیشتر باشد. بافت 1 در مقدار مناسبی از بافر RLT توسط هموژنایز هموژن گردید. مطابق جدول (1-3) : مقدار بیش از 20mg را در  $\lambda$  350 از بافر RTL و مقدار  $\lambda$  600 از بافر RLT حل شد لایزت 1 با حداکثر سرعت به مدت 3 دقیقه سانتریفوژ شد. با دقت مایع رویی به وسیله پی پت خارج شده، و از آن در مرحله 2 استفاده شد.

2- یک حجم از اتانول 70٪ به لایزت اضافه شده و به خوبی با پی پت مخلوط گردید، سپس به سرعت کار وارد مرحله 3 گردید.

3- مقدار تا کمتر از  $\lambda$  700 از نمونه که شامل هر نوع رسوب به یک RNeasy Mini spin column که در یک لوله 2ml collection قرار داده شده منتقل شده و سپس در لوله بسته شده و با دور 8000g به مدت 15s سانتریفوژ گردید و هر نوع مایع عبوری را که در لوله جمع شده بود دور ریخته شد.

برای هضم DNA، مطابق مراحل 1 تا 4 از On-column DNase از Mini Kit Part 2 استفاده گردید.

نکاتی که قبل از شروع کار با کیت RNase-Free DNase باید توجه کرد:

اگر برای اولین بار از کیت RNase-Free DNase استفاده می شود، استوک DNase I را با تزریق 550 میکرولیتر آب بدون RNase با استفاده از سوزن و سرنگ RNase-Free را باید به ویال DNase I اضافه کرده و به آرامی ویال را سروته کرده تا مخلوط شود و به هیچ عنوان ورتکس نشود.

برای ذخیره سازی طولانی مدت محلول استوک DNase I، آن را به قسمت های مساوی تقسیم کرده و در دمای منفی 20 درجه برای 9 ماه می توان ذخیره کرد همچنین می توان ویال ها را در 2-8 درجه سانتیگراد تا 6 هفته ذخیره کرد. پس از ذوب کردن ویال برای استفاده به هیچ عنوان آن را نباید مجدداً فریز کرد.

1- 350 میکرولیتر بافر RW1 را به ستون RNeasy اضافه کرده، درب ستون را بسته برای 15 ثانیه در دور 8000 g ( $\geq 10,000$  rpm) سانتریفیوژ کرده سپس جریان عبوری دور ریخته شد.

2- 10 میکرولیتر از محلول استوک DNase I (به بالا رجوع کنید) به 70 میکرولیتر بافر RDD اضافه شد و به آرامی با سروته کردن لوله مخلوط گردید و به طور مختصر سانتریفیوژ شد.

3- ترکیب انکوباسیون DNase I (80 میکرولیتر) به طور مستقیم به غشاء ستون RNeasy اضافه شد، و در دمای 20-30 درجه سانتیگراد به مدت 15 دقیقه در روی میز آزمایشگاه قرار گرفت.

4- 350 میکرولیتر بافر RW1 به ستون RNeasy اضافه شده، درب ستون را بسته، برای 15 ثانیه در بیشتراز 8000x سانتریفیوژ شد. قسمت عبوری دور ریخته شد.

5- مقدار 500  $\lambda$  از بافر RPE به ستون RNeasy Mini spin اضافه شد و سپس درب لوله بسته شده و به مدت 15 ثانیه در 8000 g  $\geq$  سانتریفیوژ شد و قسمت عبوری دور ریخته شد.

11- مقدار 500  $\mu$ l از بافر RPE به ستون RNeasy Mini spin اضافه شد درب لوله بسته شده و به

مدت 2 دقیقه در 8000g سانتریفوژ گردید.

7- ستون RNeasy Mini spin در یک لوله 1.5 ml جدید قرار داده شده و مقدار 30 تا 50  $\mu$ l از آب RNase-

free به membrane ستون به طور مستقیم اضافه شد و سپس درب لوله بسته شده و در دور 8000g به

مدت 1min سانتریفوژ شد تا RNA را شستشو دهد.

12- به منظور اینکه محصول RNA بیشتر از 30mg  $\mu$  شود مرحله 7 تکرار گردید.

Sample	Amount	Dish	Buffer RLT	Disruption and homogenization
Animal cells	$<5 \times 10^6$	$<6$ cm	350 $\mu$ l	Add Buffer RLT, vortex ( $\leq 1 \times 10^5$ cells);
	$\leq 1 \times 10^7$	6–10 cm	600 $\mu$ l	or use QIAshredder, TissueRuptor®, or needle and syringe
Animal tissues	$<20$ mg	–	350 $\mu$ l*	TissueLyser LT; TissueLyser II;
	$\leq 30$ mg	–	600 $\mu$ l	TissueRuptor, or mortar and pestle followed by QIAshredder or needle and syringe

جدول (3-1). حجم بافر RLT برای نمونه اختلال و همگن

برای سنجش کیفیت RNA خالص شده که با تکنولوژی RNeasy Mini Kit QIAGEN (cat. nos.

74104) بدست آمده و برای اطمینان از کیفیت RNA های بدست آمده از الکتروفورز با ژل آگاروز 1%

ورنگ DNA stain به همراه RNA Ladder استفاده گردید.

### 2-3-3. الکتروفورز ژل آگارز :

محلول ها و وسایل مورد نیاز

(1) پودر آگارز (سیناژن)

(2) بافر الکتروفورز<sup>52</sup> TAE

(3) DNA Gel Stain

(4) DNA Loading Dye(Thermo)

(5) تانک الکتروفورز

(6) شانه و رک ژل

(7) تامین کننده جریان الکتریسته DC

(8) دستگاه ژل داک

(9) سمپلر (Eppendorf, Germany)

(10) سر سمپلر

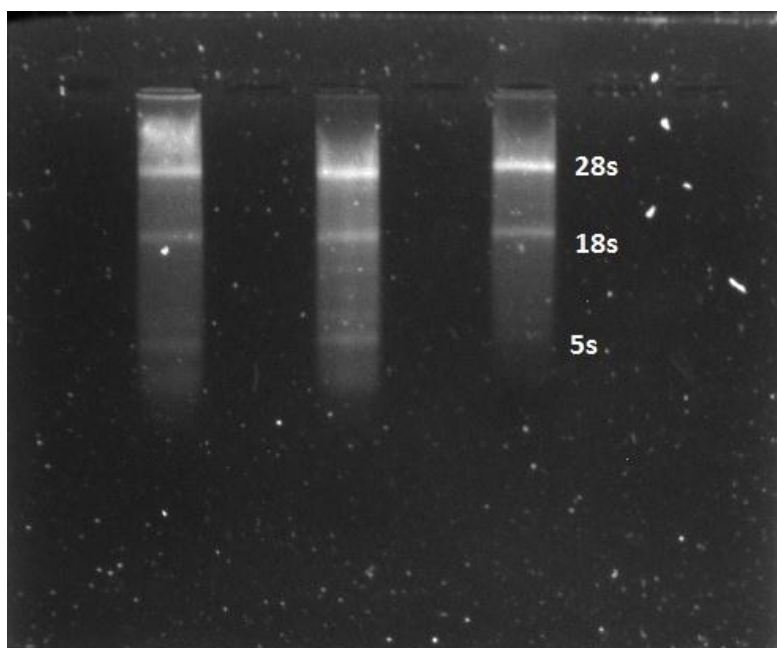
### روش انجام الکتروفورز ژل آگارز :

در این تحقیق برای بررسی کیفیت RNA استخراج شده از آگاروز 1% استفاده شد، بدین صورت که برای ساخت TAE 50X، میزان 121 گرم تریس با 250 میلی لیتر آب دیونیزه کاملاً حل شد، و 28/6 میلی لیتر اسید استیک و 50 میلی لیتر از 0.5 M EDTA (PH=8) افزوده گردید و با اضافه کردن آب دیونیزه حجم بافر به 500 میلی لیتر رسانده شد، بدین صورت یک بافر 50X ساخته شد، و برای ساختن بافر 1X

---

<sup>52</sup>.Tris base-acetic acid-EDTA

10 میلی لیتر از بافر ساخته شده به 490 میلی لیتر آب اضافه گردید. 1 گرم آگاروز با 100 میلی لیتر بافر TAE 1X داخل یک ظرف شیشه ای پریکس مخلوط شد و به مدت یک دقیقه داخل ماکروبو قرار داده شد به محض اینکه به نقطه جوش رسید ظرف خارج گردید و اگر لازم بود این عمل تکرار گردید تا محلول شفاف حاصل شود، محلول فوق در دمای اتاق قرار داده شد تا به دمای حدود 44-45 درجه برسد. 5 میلی لیتر DNA Stain (سایبرگرین) به ژل اضافه شد برای صرفه جویی در مصرف DNA Stain می توان آنرا با DNA Loading dye مخلوط کرده و بطور مستقیم درون چاهک ها با نسبت مساوی با RNA استخراج شده مخلوط کرده و بارگذاری کرد. قالب مورد نظر برای تهیه ژل روی سطح صاف قرار داده شد. شانه در 5/ سانتی متری در بالای قالب ثابت گردید. ژل به آرامی به درون قالب ریخته شد به گونه ای که در آن حباب تشکیل نگردد. قطر ژل باید مناسب و در حدود 5 تا 3 میلی متر باشد هرچقدر ضخامت قطر ژل کمتر باشد باندهای بدست آمده وضوح بیشتری خواهد داشت. پس از سفت شدن ژل، شانه از ژل خارج شد تا چاهک ها در ژل نمایان شود. عمق چاهک ها باید مناسب باشد. ژل درون تانک الکتروفورز حاوی بافر TAE 1X قرار داده شد طوری که بافر سطح ژل را تا 2 میلی متر بپوشاند. همانطور که قبلاً توضیح داده شد می توان برای صرفه جویی 2µl از مخلوط رنگ و بافر لودینگ که قبلاً با هم در یک ویال مخلوط شده را با استفاده از یک سمپلر برداشته و با 2µl از RNA استخراج شده مخلوط کرده و در نهایت بدون آنکه موجب پارگی ته چاهک گردد در داخل آن با دقت بارگذاری گردد. الکترودها به گونه ای به منبع نیرو وصل شدند که چاهک ها به سمت قطب منفی باشد (اگر با دقت به داخل تانک نگاه کنید همیشه حباب های ایجاد شده در سمت قطب منفی هستند). الکتروفورز با ولتاژ 90 در 250 آمپر در حدود یک ساعت بطول می انجامد، با گذشت زمان می توان حرکت باندها را در روی ژل مشاهده کرد. هنگامیکه حرکت باندها به اندازه 3/4 طول ژل رسید می توان جریان برق را قطع کرده ژل را در داخل دستگاه ژل داک گذاشته و از آن عکس گرفت.



شکل (1-3). استخراج RNA از بیوپسی بافت بیضه. باندهای مربوط به 5sr, 18sr, 28sr به وضوح قابل مشاهده است.

در تفسیر نتایج حاصل از استخراج RNA در ژل الکتروفورز توجه به نکات زیر می تواند در کیفیت محصول بدست آمده موثر باشد :

مقدار RNA در سلول یوکاریوت  $10^{-5}$  میکروگرم است که از این مقدار ، 80 تا 85 درصد RNA ریبوزومی و 15 تا 20 درصد RNA کوچک از قبیل tRNA و snRNA است و فقط در حدود 1 تا 5 درصد mRNA است که در اندازه های متفاوت بوده ولی معمولاً انتهای 3' آنها پلی آدنیل است.

اندازه RNA و سنجش کیفیت آن از روی آگاروز ژل الکتروفورز :

اندازه mRNA می تواند بزرگتر یا کوچکتر از RNA ریبوزومی باشد. RNA با کیفیت بالا دارای ویژگی های زیر است :

شدت  $^{53}$  نسبت باند 28s rRNA به باند 18s rRNA ، 2 به 1 است. اگر شدت باند 18s rRNA از باند 28s

rRNA بیشتر باشد، و یا اگر هر دو نوارها پخش شده باشند<sup>54</sup>، احتمالاً RNA تخریب شده است.

<sup>53</sup> . intensity

<sup>54</sup> . Smear

شرایط نگهداری : RNA در آب فوق العاده خالص RNase-free در منفی 70 درجه سانتی گراد نگه داری شد.

### 3-3-3. سنتز cDNA :

برای سنتز cDNA از کیت (BIONERR) (dN6) AccuPowerR CycleScript RT PreMix استفاده شد. این کیت رونویسی معکوس آماده برای استفاده است، که می تواند سنتز cDNA همگن را از طریق چرخه های دمایی تولید کند. این محصول شامل تمام اجزاء از جمله ترانس کریپتاز معکوس مقاوم به حرارت CycleScript ، dNTPs ، reaction buffer ، primer و تثبیت کننده های آنزیم رونویسی معکوس است و این کیت به مدت 2 سال در 20- درجه سانتیگراد پایدار است. AccuPower® Cycle Script RT PreMix (dN6) فعالیت رونویسی معکوس بالایی در محدوده گسترده ای از دمای های معمولی بین 42 درجه سانتی گراد و 55 درجه سانتی گراد دارد. این واکنش در از 2 یا 3 مرحله تشکیل می شود.

مرحله اول : در این مرحله که در دمای 15 ~ 25 درجه سانتیگراد انجام می شود، پرایمر های کوتاه بطور کامل به رشته الگو متصل می شوند (annealing).

مرحله دوم : این مرحله که بصورت اختیاری است در دمای 42 ~ 48 درجه سانتیگراد برای سنتز cDNA انجام می شود.

مرحله سوم : این مرحله که در دمای بالای 50 ~ 55 درجه سانتیگراد انجام می شود، که در آن ساختار دوم RNA الگو مانع رونویسی معکوس می شود ذوب شده و رونویسی معکوس نیز رخ می دهد.

استفاده از این کیت دارای مزیت های زیادی است، از جمله کاهش قابل توجه در زمان راه اندازی واکنش، بدون نیاز به اضافه کردن پرایمر و مرحله دناتوراسیون RNA الگو.

هریک از لوله های CycleScript® AccuPower شامل تثبیت کننده (حق ثبت اختراع در ایالات متحده و کره) است، که می تواند ترانس کریپتاز معکوس CycleScript را تا 2 سال در -20 درجه سانتی گراد حفظ کند. برای استفاده از این کیت کافی است تا RNA الگو و آب DEPC را به میکروتیوب های لیوفیلیزه اضافه کرد. در این تحقیق مقدار 4 میکرولیتر از RNA استخراج شده به ویال لیوفیلیزه اضافه گردید (توصیه شده غلظت RNA توتال الگو در حدود 0.1 تا 1 میکروگرم باشد). حجم واکنش 20 میکرولیتر است بنابراین با اضافه کردن 16 میکرولیتر از آب DEPC حجم واکنش به  $\lambda 20$  رسانده شد. پلت شفاف ته ویال لیوفیلیزه با ورتکس یا ضربه زدن، و اسپین مختصر بطور کامل حل شد. پلت باید به طور کامل حل شود. سنتز cDNA با واکنش چرخه ای طبق مراحل زیر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر 96 خانه Veriti 96 Well, Applied Biosystems با توجه به دمای ذکر شده در کیت انجام گرفت:

CT RT 1		
Step 1	15~25°C 30 sec: primer annealing	Repeat 12 times or less
Step 2	42~45°C 4 min: cDNA synthesis	
Step 3	55°C 30 sec: melting secondary structure & cDNA synthesis	
Heat inactivation	95°C 5min	

برای نگهداری طولانی مدت cDNA سنتز شده، ویال ها 1 در فریزر -80 درجه سانتی گراد قرار داده شد.

### 4-3-3. طراحی پرایمر:

به منظور بررسی بیان در سطح RNA پرایمرها و پروب های اختصاصی برای ژن Contrin با استفاده از توالی اگزون این ژن ها در نرم افزار Gene runner (Version 3.05) طراحی شد.

از آنجاییکه در اغلب موارد ممکن است DNA ژنومی (gDNA) به همراه RNA از بافت مورد نظر استخراج شود به همین دلیل می تواند به عنوان یک الگو در فرآیندهای پایین دستی، مانند PCR عمل کنند و بنابراین



نتیجه مثبت کاذب، از طریق تکثیر آلودگی DNA ژنومی به دست خواهد آمد. از این رو، بهتر است که پرایمرها و پروب های محدوده ی محل اتصال اگزون-اگزون در mRNA هدف برای جلوگیری از تکثیر آلودگی DNA ژنومی طراحی شود. از آنجائیکه cDNA ها به هیچ عنوان دارای توالی اینترونی نیستند و طراحی پرایمرها بصورت exon-exon junction تضمین می کند که آنها هرگز به توالی DNA ژنومی متصل نمی شوند زیرا توالی پرایمر ها مکمل توالی DNA ژنومی نیست. در مواردی که توالی اینترونی وجود نداشته باشد (به عنوان مثال، باکتری ها، ویروس ها، گیاه خاص و توالی میتوکندری)، و در جایی که چنین معیارهای طراحی نمی تواند اعمال شود، نظیر همین تحقیق که در آن بعلت کم بودن تعداد اگزون ژن های مورد مطالعه نرم افزار مورد استفاده قادر به طراحی پرایمر دلخواه نیست، عاقلانه است تا از تکنیک جداسازی خوب RNA، با استفاده از آنزیم DNase قبل از مرحله رونویسی معکوس میزان gDNA زمینه ای را به حداقل برسانیم.

برای اجتناب از اتصال پرایمر های طراحی شده به سایر توالی های مشابه با توالی های ژن مورد نظر از BLAST<sup>55</sup> استفاده شد. برنامه های BLAST توالی پرس و جو (query) را در تمام توالی های یک پایگاه

داده مشخص مقایسه می کند. سرورهای BLAST عمومی بر روی اینترنت

([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) در دسترس هستند.

### 3-3-4-1. توالی پرایمر استفاده شده در روش Real-time PCR :

- Y box binding protein 2 (YBX2) با توالی مرجع NM\_002762.2 در پایگاه داده های NCBI،

دارای 9 اگزون است و بر روی کروموزوم 17p13.1 قرار دارد. برای طراحی پرایمر از اگزون شماره

9 استفاده شده است. محصول PCR این پرایمر که توالی آن در زیر نشان داده شده 150bp بود.

---

<sup>55</sup> . Basic Local Alignment Search Tool

**Forward: 5'- CCCTACCCAGTACCCTGCT-3'**

**Reverse: 5'- CCTTCCTTCAACCCTTGATAA-3'**

• (GAPDH) glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase با توالی مرجع

NM\_002046.4 در پایگاه داده های NCBI، دارای 9 اگزون است و بر روی کروموزوم 12p13

قرار دارد. برای طراحی پرایمر و پروب از اگزون شماره 8 استفاده شد. محصول PCR این پرایمر که

توالی آن در زیر نشان داده شده 93bp بود.

**Forward: 5'- TCAAGAAGGTGGTGAAGCAG -3'**

**Reverse: 5'-CGCTGTTGAAGTCAGAGGAG-3'**

### 5-3-3. ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی :

انتخاب ژن های کنترل داخلی مهم است چرا که ممکن است بر نتیجه مطالعه در RT-qPCR تاثیر گذارد

باشد. کنترل های داخلی (house keeping gene) برای دو هدف مورد استفاده قرار می گیرند؛

(1) برای نرمال سازی نتیجه RT-PCR که با فرمول در  $2^{-\Delta C_t}$  یا  $2^{\Delta\Delta C_t}$  ارائه شده. لازم بذکر

است که در مطالعه حاضر از فرمول  $2^{-\Delta C_t}$  جهت بررسی نتایج بدست آمده استفاده شده است.

(2) کنترل داخلی حضور بازدارنده و یا کیفیت ساخت cDNA را هم می تواند نشان می دهد.

مقدار CT ممکن است از شخصی به شخص دیگر و یا از شرایطی به شرایط دیگر بر اساس بهره وری

تخلیص تغییر کند و آن تغییر به علت تفاوت در نمونه ها نیست. و بنابراین پیدا کردن یک کنترل داخلی

مناسب که تحت تاثیر افزایش یا کاهش بیان در مقایسه با ژن های مورد بررسی در آن تحقیق مشخص قرار

نگرفته اند بسیار مهم است.

در زیست شناسی مولکولی، ژن های House Keeping معمولاً ژن های ساختاری اند که برای نگهداری عملکرد اولیه سلولی مورد نیازند، و در تمام سلول های یک ارگانیسم در شرایط طبیعی و پاتوفیزیولوژیکی بیان می شوند.

### 3-3-6. روش Real-time PCR :

Real-time RT-PCR پیشرفته‌تری است که نسبت به سایر روش های مرسوم تعیین مقدار دارای چند مزیت اضافی است. مزیت اصلی real-time RT-PCR این است که با ردیابی میزان تکثیر محصول در هر دور، مقداری الگوی اولیه را به طور دقیق و قابل تکرار تعیین می کند، در حالی که در روش مرسوم، محصول واکنش در انتها اندازه گیری می شود. به علاوه real-time RT-PCR روش سریعی است که ممکن است چند نوع ژن را به طور همزمان آنالیز کند و دیگر نیازی به روش های تعیین مقدار پس از PCR نیست. به علت حذف مراحل آنالیز پس از PCR، وقوع آلودگی کاهش می یابد و بازده بالاتری حاصل می شود. اگر چه real-time RT-PCR مزایای بسیاری نسبت به روش های مرسوم دارد، معایبی نیز دارد: هزینه بالاتر و ناتوانی در تشخیص اندازه محصول می تواند بین تکثیر cDNA و DNA را مشکل نماید (129).

real-time RT-PCR در پلیت های 96 خانه انجام می شود و سیگنال فلوروسنت (تجمع آمپلیکون) با استفاده از ترموسایکرها real-time RT-PCR تشخیص داده می شود. همه اجزای مورد استفاده در روش های متداول RT-PCR در real-time RT-PCR نیز وجود دارد اما علاوه بر آنها یک گزارش گر فلورسنسی مثل یک رنگ متصل شونده به DNA یا یک پرایمر اولیگونوکلوئوتیدی فلورسنت نیز در واکنش حضور دارند. گزارش گر فلورسنسی تنها زمانی نور فلورسنس را ساطع می کند که محصول، تکثیر شده باشد، لذا افزایش سیگنال فلورسنس ثبت شده نسبت مستقیمی با افزایش محصول در واکنش دارد. هرچه غلظت الگو

بیشتر باشد، افزایش معنی دار فلورسنس، زودتر مشاهده می شود. شدت سیگنال فلورسنس در مراحل اولیه تکثیر به طور عمومی 3 تا 15 چرخه اول تغییر نمی کند یا تغییرات بسیار جزئی نشان می دهد و این میزان فلورسنس، فلورسنس زمینه یا خط پایه در نظر گرفته می شود. آستانه فلورسنس را باید کمی بالاتر از این خط پایه در نظر بگیریم، در این حالت افزایش معنی داری در شدت فلورسنس در دستگاه ثبت خواهد شد زیرا شدت سیگنال، بالاتر از میزان آستانه بوده است، که به آن "چرخه آستانه" یا  $C_T$  می گویند. با دانستن میزان  $C_T$  برای یک واکنش و رسم یک منحنی استاندارد غلظت cDNA شدت فلورسنس در مقابل غلظت cDNA، می توان به غلظت الگوی اولیه پی برد (129).

### 3-3-6-1. تهیه سریال رقت به منظور بررسی کارایی<sup>56</sup> پرایمرها :

قبل از انجام آزمایش Real-time \PCR بر روی نمونه های مورد مطالعه می بایست کارایی پرایمرهای مورد استفاده سنجیده شود چرا که نزدیک بودن کارایی پرایمرها در جواب نهایی بسیار مهم است. مواد و وسائل مورد نیاز :

1) کیت Bulk (Probe qPCR), Premix Ex Taq<sup>TM</sup> (TaKaRa, Japan) محتوی کیت شامل موارد زیر است: رنگ ROX Reference Dye به منظور نرمال سازی سیگنال ها در بین چاهک ها بکار می رود. خود بافر شامل TaKaRa Ex Taq HS, dNTP Mixture,  $Mg^{+2}$ , and Tli RNase H: است.

2) پرایمر Forward با غلظت 10pmol/ $\mu$ l

3) پرایمر Reverse با غلظت 10pmol/ $\mu$ l

4) نمونه cDNA افراد گروه کنترل

---

<sup>56</sup> Efficiency.

(5) آب DEPC

(6) سمپلر متغیر (Eppendorf, Germany)

(7) دستگاه ABI 7500 (Applied Biosystem) Real time PCR

## روش کار :

اولین گام در تعیین کارایی پرایمر ساختن یک Gene Pool از cDNA بدست آمده از نمونه های گروه شاهد (کنترل) است. برای این کار  $\lambda 2$  از cDNA هر کدام از نمونه های کنترل برداشته شده در داخل یک میکروتیوب 1.5 میلی لیتری مخلوط (MIX) ساخته شد، سپس برای اینکه سریال رقت  $10^5$  ساخته شود  $\lambda 1$  از مخلوطی که ساخته شده با  $\lambda 9$  از آب DEPC در یک میکروتیوب دیگری باهم مخلوط گردید . حال برای اینکه پنج سریال رقت که به ترتیب 0.01, 0.1, 1, 10, 100 به دست آید  $\lambda 1$  از میکروتیوب یک برداشته و دوباره با  $\lambda 9$  از آب DEPC مخلوط گردید و آن شماره دو نامیده شد، و به ترتیب این کار تا ساختن میکروتیوب پنجم ادامه داده شد. لازم بذکر است که بررسی کارایی پرایمر برای هر کدام از ژن های مورد مطالعه در این تحقیق انجام شد. (4 ژن اصلی و یک ژن کنترل داخلی).

گام بعدی، ساختن یک Master Mix بود و از آنجائیکه بررسی کارایی بصورت Duplicate انجام می شود . تمام ترکیبات Master Mix در ضریب 2 اعمال گردید. با کمی دقت می توان متوجه این نکته شد که برای هر جفت پرایمر 10 چاهک در پلیت 96 تایی اختصاص می یابد که برای رسم نمودار کارایی واکنش (E) که با معادله  $E=10^{-1/\text{slope}}$  محاسبه می شود، کافی است. به این نکته توجه کرد که هنگامی که چاهک های پلیت بارگذاری می شود همیشه از رقت کم شروع گردد!

---

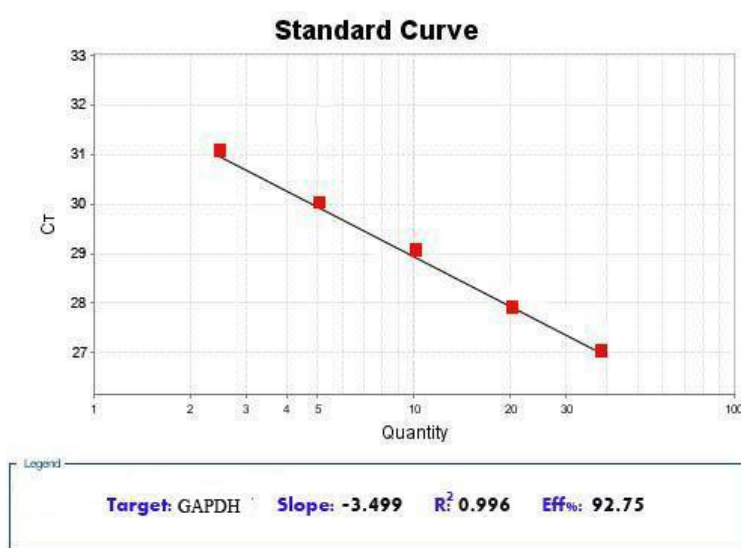
<sup>57</sup>.Serial dilution

منحنی استاندارد<sup>۵۸</sup> توسط خود دستگاه رسم شده که اطلاعاتی شامل کارایی، شیب نمودار و رگرسیون  $R^2$  داده شد. مشخصات هر نمودار مورد بررسی قرارگرفت یک نمودار مناسب دارای این مشخصات می باشد.

کارایی 90-110، شیب نمودار<sup>۵۹</sup>  $-3/1$  تا  $-3/6$  و رگرسیون<sup>۶۰</sup> 98-100.

کارایی باید بین 90 درصد تا 110 درصد باشد. کارایی کمتر از 90٪ باید بهینه شود، لذا بررسی اندازه

آمپلیکون، ساختارهای ثانوی و طراحی پرایمر می بایست دوباره چک شود.



شکل (3-3). نمودار تعیین کارایی برای پرایمرهای GAPDH

برای استفاده از این کیت در دستگاه Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR

System طبق جدول (2-3) زیر عمل گردید.

Reagent	Volume
Premix Ex Taq (2X) (Probe qPCR), Bulk	10µl
PCR Forward Primer (10 µM)	0.4µl
PCR Reverse Primer (10 µM)	0.4µl

<sup>58</sup>.Standard Curve

<sup>59</sup>.Slope

<sup>60</sup>.Regression

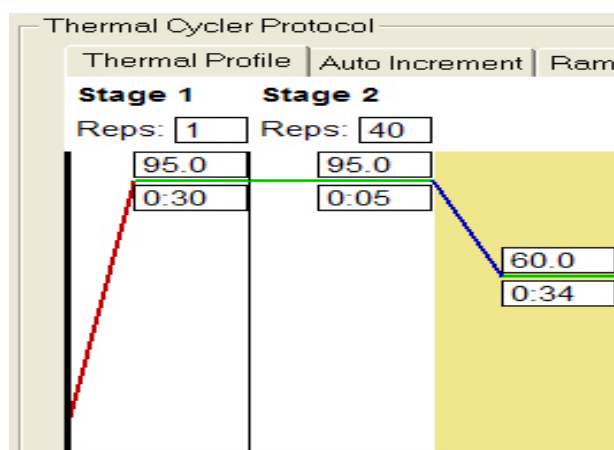
TaqMan® probe	0.8µl
ROX Reference Dye	0.04µl
Template	2 µl
dH2O (sterile distilled water)	6.36 µl

لازم به توضیح است که حجم نهایی واکنش 20 میکرو لیتر بود.

برنامه دمایی به دستگاه Real-time بصورت زیر داده شد :

30 ثانیه در 95 درجه سانتیگراد به عنوان اولین گام برای دناتوراسیون و پس از 40 سیکل در 95 درجه

سانتیگراد به مدت 5 ثانیه و 60 درجه سانتیگراد به مدت 34 ثانیه.



### 2-6-3-3. انجام تکنیک Real time PCR بر روی نمونه های مورد مطالعه :

بعد از مطمئن شدن از اینکه کارایی پرایمر ها در یک محدوده طبیعی و نزدیک به هم قرار دارد، بر روی

نمونه های cDNA سنتز شده طبق شرایطی که در بالا توضیح داده شد 2 بار، Real-time انجام گرفت و

برای نمونه های که در آنها تغییرات زیادی در بین جواب اول و دوم دیده می شد دوباره آزمایش را تکرار

گردید.

### 3-6-3-3. نحوه تجزیه و تحلیل داده ها :

$Ct^{61}$  برای هر کدام از نمونه ها توسط دستگاه مشخص می شود. برخلاف روش معمول که برای آنالیز نمونه های بر مبنای فرمول  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  است، در انجام این تحقیق مبنای محاسبه افزایش و یا کاهش بیان نمونه ها در گروه آزواسپرم و گروه کنترل از فرمول  $2^{-\Delta Ct}$  استفاده گردید (130).

برای نرمال سازی مقدار چرخه آستانه (Ct) mRNA های هدف در نمونه های بیمار و کنترل از مقدار Ct

کنترل داخلی (GAPDH)، استفاده شد:  $(\Delta CT = CT_{target} - CT_{Gapdh})$ .

### 3-6-3-4. بررسی آماری داده ها :

برای تعیین اختلاف معنی دار بودن بین دو گروه مورد مطالعه، تجزیه و تحلیل آماری شامل میانگین، انحراف معیار (SD)، ضریب همبستگی ( $R^2$ ) و آزمون unpaired t-test با استفاده از نرم افزار Prism (نسخه 3) انجام شد. علاوه بر این یکی از روش های آنالیز واریانس (ANOVA) برای تعیین تفاوت معنی دار بودن بین گروه های مورد مطالعه انجام شده است. همچنین همبستگی خطی با استفاده از ضریب پیرسون همبستگی مورد آزمون قرار گرفتند. تمام آزمایشات را در سطح اطمینان 95٪ انجام شد.

---

<sup>61</sup> . Cycle threshold



## فصل چهارم

## نتایج ویافته ها

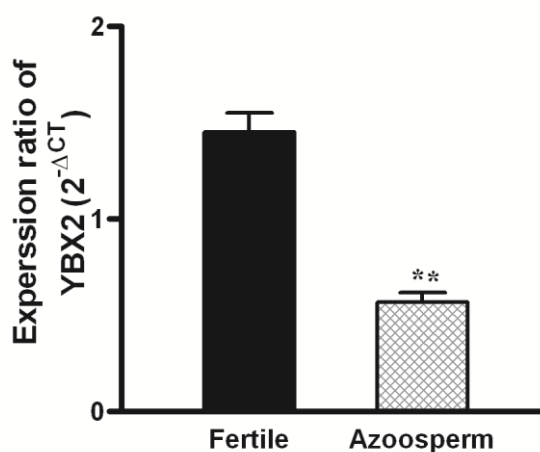
Exon1 ژن YBX2 دارای 10 پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی است. (SNPs). در طرح قبلی ما همه این SNP ها را در نمونه ها ارزیابی کردیم، اما تنها 2 پلی مورفیسم تفاوت فراوانی واضح در میان گروه های مورد مطالعه داشت. این پلی مورفیسم ها rs222859 G> T، rs8069533T> C بودند. نتایج تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که فراوانی پلی مورفیسم rs8069533T>C دارای تفاوت معنی داری بین دو گروه بیمار و کنترل در همه ژنوتیپها نبود. در مطالعه پلی مورفیسم rs222859 G>T فراوانی ژنوتیپ TT در نمونه آواسپرم (24٪) در مقابل آنهایی که طبیعی بودند (8٪) به طور قابل توجهی بالاتر بود ( $P < 0.05$ ). در فراوانی ژنوتیپ هتروزیگوت GT تفاوت معنی داری بین بیماران آواسپرم و افراد نرمال نشان داده نشده است. ( $P > 0.05$ ). از آنجا که در پلی مورفیسم rs222859 T<G، فراوانی ژنوتیپ TT در نمونه های خون مردان آواسپرم به طور قابل توجهی بالاتر بود، ما فراوانی ژنوتیپ های مختلف این پلی مورفیسم را در بافت بیضه افرادی که کاندید روش استخراج اسپرم از بیضه (TESE) بودند ارزیابی کردیم.

نتایج نشان داد که همه 13 تا از مردان آواسپرمی که ژنوتیپ TT در نمونه های خون خود داشتند، همان پلی مورفیسم را در بافت بیضه داشتند. از نظر ژنوتیپ GG، 23 نفر از 25 تا آواسپرمیای این ژنوتیپ را در نمونه های خون و بیضه ها خود داشتند، و 2 تا از آنها ژنوتیپ TT در نمونه بیضه داشتند. فراوانی ژنوتیپ CA هم در خون و هم در نمونه بافت بود.

در این تحقیق 60 نمونه خون و testis افراد آواسپرم مورد بررسی قرار گرفت که از این 60 نمونه در طرح قبلی نشان داده شده بود که 13 نمونه دارای پلی مورفیسم rs 222859 می باشند و 47 نمونه فاقد این پلی مورفیسم می باشند. در این تحقیق میزان بیان این ژن در 2 گروه دارای پلی مورفیسم و فاقد پلی مورفیسم مورد بررسی قرار گرفت. در ارتباط با نمونه خون 30 نمونه کنترل نیز وجود داشت. افرادی بودند که بارور بوده و باروری آنها ثابت شده بود. در زمینه نمونه بافت بیضه 12 نمونه کنترل وجود داشت افرادی بودند که وازکتومی بازگشتی انجام داده بودند و اسپرماتوزن نرمال داشتند.

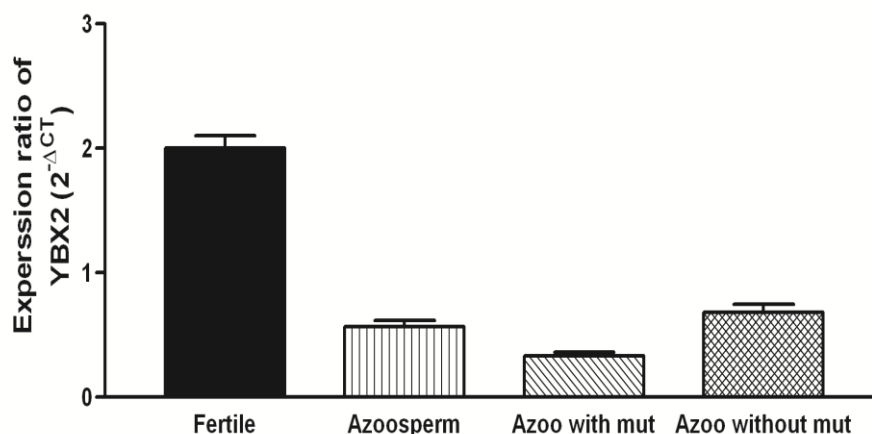
نتایج مقایسه میزان بیان ژن YBX2 که در نمونه خون افراد نرمال و آزوسپرم نشان داد که میزان بیان ژن YBX2 بطور معنی داری در نمونه خون افراد آزوسپرم  $2^{-\Delta ACT} : 0/5 \pm 0/12$  کمتر از افراد نرمال می باشد  $2^{-\Delta ACT} \neq 2 \pm / 38$  (P<0/05).

بررسی میزان بیان ژن YBX2 در نمونه بافت بیضه افراد آزوسپرم در مقایسه با نمونه کنترل کاهش میزان بیان این ژن را بطور معنی دار نشان داد.  $2^{-\Delta ACT} : 0/47 \pm 2$  (P<0/05 )



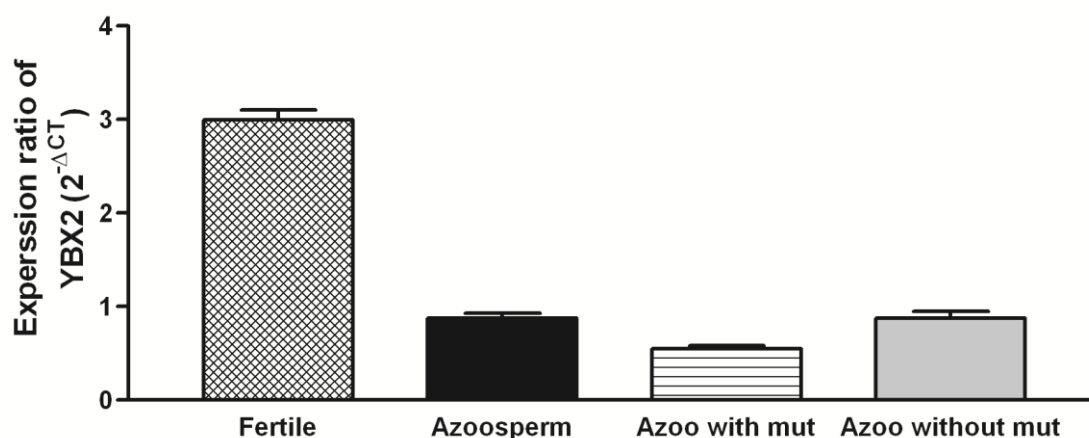
شکل 1: در شکل 1 کاهش معنی دار میزان بیان ژن YBX2 در نمونه خون افراد آزوسپرم نسبت به نمونه کنترل نشان داده شده است.

در قسمت بعدی کار، مقایسه میزان بیان ژن یعنی گروه های دارای پلی مورفیسم و بدون پلی مورفیسم مورد مطالعه قرار گرفت. بررسی میزان بیان ژن در نمونه خون افراد دارای پلی مورفیسم rs 222859 و بدون پلی مورفیسم rs 222859 نشان داد که تفاوت معنی داری در میزان بیان ژن بین این دو گروه وجود ندارد.  $2^{-\Delta ACT} : -0/33 \pm 0/1$  در نمونه های دارای پلی مورفیسم  $2^{-\Delta ACT} : 0/47 \pm 0/2$  در نمونه های بدون پلی مورفیسم (P>0.05).



شکل 2: در این شکل نشان داده شده با اینکه در نمونه خون افراد آروسپرم میزان بیان ژن YBX2 بطور معنی‌داری کاهش یافته است ( $P < 0/05$ ) ولی تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های دارای پلی‌مورفیسم و بدون پلی‌مورفیسم در میزان بیان ژن وجود ندارد ( $P > 0/05$ ).

همچنین بررسی میزان ژن در نمونه بافت بیضه افراد آروسپرم دارای پلی‌مورفیسم rs 222859 و بدون پلی‌مورفیسم rs 222859 نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین این دو گروه در کاهش میزان بیان ژن وجود نداشت.  $2^{-\Delta ACT}$ :  $0/57 \pm 0/3$  در نمونه‌های دارای پلی‌مورفیسم  $2^{-\Delta ACT}$ :  $0/62 \pm 0/4$  در نمونه‌های بدون پلی‌مورفیسم ( $P > 0/05$ ).



شکل 3: در این شکل نشان داده شده با اینکه در نمونه بیضه افراد آروسپرم میزان بیان ژن YBX2 بطور معنی‌داری کاهش یافته است ( $P < 0/05$ ) ولی تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های دارای پلی‌مورفیسم و بدون پلی‌مورفیسم در میزان بیان ژن وجود ندارد ( $P > 0/05$ ).

## فصل پنجم

### بحث و نتیجه گیری

### پیشنهادها

## « بحث و بررسی »

بیش از 3000 ژن وجود دارد که نقش مخصوص خود را در باروری جنس مذکر دارا هستند در مطالعات با مدل حیوانی، مطالعه yany و همکاران او (2005) نشان داد که موش‌های msg2-nay نوعی اختلال به صورت افزایش مرگ خود به خودی سلولی اسپرماتوئست‌های حاصل تقسیم میوز داشتند و اسپرماتوئست‌های جهش یافته مولد جنس مذکر در لوله‌های spermatozoa و نازا بودند نتایج آنها تأکید بر نقش عمده این پروتئین در باروری جنس مذکر داشت. این تحقیق نخستین گزارش مطالعه اجتماعی میان پلی مورفیسم‌های (polymorphisim) تنظیم کننده کلیدی فرآیند تولید اسپرماتوئست و ناباروری جنس مذکر میان جمعیت ایرانی می باشد. ما نمونه‌های خود را بر اساس آزمایش تجزیه و تحلیل مایع منی semen انتخاب کرده و آنها را به چهار گروه شامل گروه شاهد، گروه azoospermic، گروه oligospermic و گروه asthenospermic تقسیم کردیم. (عدم وجود اسپرم در مایع منی) (تعداد پایین اسپرم در مایع منی) (کاهش حرکت اسپرم‌ها در مایع منی)

پلی مورفیسم‌های مطالعه شده بر اساس تحقیقات Hammoud و همکاران او و نیز Deny و همکاران او بود. آنها تمامی نواحی exon، intron این ژن را در یک توالی قرار دارند و تعدادی پلی مورفیسم در این نواحی ژنی یافتند. برخی از این پلی مورفیسم‌ها به صورت برجسته‌ای در مردان نابارور بیش تر بودند و در ارتباط با تولید اسپرم و/ یا عملکرد آن بودند.

ما قسمت exoni را مورد مطالعه قرار دادیم چراکه در مطالعات دیگر، درمیان نواحی exon، پلی مورفیسم‌های exoni بیش تر از دیگر نواحی exon بود exoni این ژن یک ناحیه با حفاظت زیاد تحت عنوان cold-shock را در میان گونه‌های پستانداران دارا می باشد و حاوی یک منطقه فسفر یک کردن casein kinase2 می باشد (sakthivet و همکاران او) نتایج ما نشان داد که توالی تنها یک پلی مورفیسم (ژنوتیپ

TT مربوط به rs222857) به صورت قابل توجهی در مردان با azoospermia در مقایسه با گروه شاهد، asthenosperm و diyospermic بالاتر است. در مطالعه deny و همکاران او (برخلاف مطالعه ها) ژنوتیپ TT در exoni تفاوت چندانی میان گروه شاهد و مردان نابارور در میان جمعیت چین نداشت در رابطه با پلی مورفیسم t>c rs8069533 ، Deny و همکاران او نشان دادند که شمار توالی (allele) c در گروه شاهد در مقایسه با مردان نابارور بالاتر بود و آنها نتیجه گرفتند که این ال (allele) اثر محافظتی روی باروری دارد اما در مطالعه ها تفاوت قابل توجهی میان گروه بسیار و شاهد وجود نداشت. پلی مورفیسم های exoni که در مطالعه Hammed و همکاران او گزارش شد تفاوت چندانی میان گروه های مطالعه شده در مطالعه ما نشان نداد. نتایج ما هم چنین نشان داد که در پلی مورفیسم های rs222859، تمامی بیماران که ژنوتیپ TT جهش یافته در نمونه های خونی خود داشتند، در بافت های بهینه آنها نیز، ژنوتیپ مشابه وجود داشت. توالی ژنوتیپ GT در بافت خونی و بیضه مشابه بود اما در 8 درصد بیماران که ژنوتیپ GG طبیعی در نمونه های خونی خود داشتند، ژنوتیپ جهش یافته یا TT در بافت بیضه آنها وجود داشت. ناسازگاری میان سلول های زایا و خون در مطالعات مختلف گزارش شده است. در این رابطه Dada و همکاران او و saktivel و همکاران او دریافتند که حذف توالی yg در نمونه های اسپرم بیماران در مقایسه با نمونه های خونی آنها بیش تر بود. khazamipour و همکاران او اثبات کردند که ژن mthfr در بافت بیضه بیماران azoospermic حاوی گروه متیل (CH<sub>3</sub>) است اما آنها در نمونه های خونی این بیماران گروه متیل (CH<sub>3</sub>) مشاهده نکردند. این نتایج حاکی از آن است که غربالگری جهش های ژنی دخیل در تولید اسپرم (spormatoyenesis) در نمونه های خونی، کافی نیست و بهتر است نمونه های اسپرم نیز غربالگری شوند.

در تحقیقات پیشین ما، بیان ژنی کم تر در این ژن را در بافت های بیضه مردان azoospermic با توقف بلوغ در مقایسه با گروه شاهد نشان دادیم. (najafipour و همکاران) در روندی مشابه مطالعه قبلی، ارزیابی

میان ژنی در نمونه های خونی، بیان کم تر این ژن در مردان azoospermic مشاهده شد اما در نمونه های مردان oligospermic و asthenospermic هیچ کاهش بیان ژنی مشاهده نکردیم. در هر دو نمونه های خونی بیضه، تفاوت چشم گیری در بیان ژنی در میان نمونه های جهش یافته و بدون جهش وجود نداشت. در این مطالعه ژنوتیپ جهش یافته TT در ناحیه exoni بود بنابراین ما انتظار نداشتیم که این جهش باعث کاهش بیان ژنی در سطح mRNA گردد. در مطالعات آینده بهتر است که در رابطه با تأثیر این جهش بر روی ساختار سه بعدی پروتئین تحقیق و بررسی به عمل آید و کاهش بیان ژنی این ژن در نمونه های خونه و اسپرم مردان azoospermic احتمالاً به علت جهش هایی دیگر در نواحی promoter ژن دیگر نواحی exon و intron این ژن می باشد. پیشنهاد ما غربالگری تمامی promoter، intron ها و exon های این ژن در میان جمعیت ایرانی در مطالعات آینده می باشد. در نتیجه، اطلاعات حال حاضر حاکی از آن است که ژن YBX2 ممکن است با ناباروری جنس مذکر همراهی داشته باشد بنابراین بهتر است غربالگری جهش های نمونه های اسپرمی نیز علاوه بر نمونه های خونی در مطالعات آینده، لحاظ گردد.

## پیشنهادهات :

در مطالعات آینده بهتر است به بررسی اثر این جهش در ساختار 3D پروتئین انجام شود. بیان این ژن در نمونه های خون و اسپرم مردان آزواسپرم احتمالاً توسط جهش در دیگر پروموتورها و دیگر مناطق اگزونی و اینترونی این ژن ایجاد می شود. ما غربالگری از تمام promotore، اینترون ها و اگزون ها این ژن در میان جمعیت ایران در مطالعات آینده پیشنهاد میکنیم.

در نتیجه، اطلاعات موجود نشان می دهد که ژن YBX2 ممکن است با ناباروری مردان در ارتباط باشد و بهتر است جهش های نمونه اسپرم و نمونه خون در مطالعات آینده بررسی شود.



## فصل ششم

## فهرست منابع

## Reference :

- 1) World Health Organization 2000 .WHO manual for the standardised investigation and diagnosis of the infertile couple. Cambridge: Cambridge University Press.
- 2) Jungwirth A., Giwercman A., Tournaye H., Diemer T2012. European Association of Urology Guidelines on Male Infertility. european urology . 62: 324-323.
- 3) World Health Organization 2010. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 5th edn. Cambridge: Cambridge University Press.
- 4) Alaa Hamada Sandro C2011. Esteves and Ashok Agarwal Unexplained male infertility: potential causes and management Human Andrology. 1:2–16.
- 5) Holstein AF1999.Spermatogenesis beim Menschen. Grundlagenforschung und Klinik. Ann Anat. 181:427-436.
- 6) Holstein AF2003. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. Reproductive Biology and Endocrinology.1:107.
- 7) Davidoff MS., Breucker H., Holstein AF., Seidel K1990. Cellular architecture of the lamina propria of human seminiferous tubules.Cell Tissue Res.262:253-261.
- 8) Romero C, updated by Erin Barley with contributions from Joan Sharp 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings.

**9)** Holstein AF., Roosen-Runge EC., Schirren C1988. Illustrated pathology of human spermatogenesis. Berlin: Grosse.

**10)** Holstein AF., Roosen-Runge EC1981. Atlas of Human Spermatogenesis. Berlin: Grosse.

**11)** Breucker H., Schaefer E., Holstein AF1985. Morphogenesis and fate of the residual body in human spermiogenesis. Cell Tissue Res. 240:303-309.

**12)** Clermont Y: The cycle of the seminiferous epithelium in man. Amer J Anat 1963, 112:35-51.

**13)** Schulze W, Salzbrunn A1992. Spatial and quantitative aspects of spermatogenic tissue in primates In: Spermatogenesis-Fertilization-Contraception Edited by: Nieschlag E, Habenicht UF. Berlin, Heidelberg. New York: Springer. 267-283.

**14)** WHO Manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile couple1993. Edited by: Rowe PJ, Comhaire FH, Hargreave TB, Mellows HJ. Cambridge: Cambridge University Press.

**15)** DeKretser DM, Holstein AF1976. Testicular biopsy and abnormal germ cells. In: Human Semen and Fertility Regulation in Men Edited by: Hafez ESE. St. Louis: Mosby. 332-343.

**16)** Schulze W., Thoms F., Knuth UA1999. Testicular sperm extraction (TESE): comprehensive analysis with simultaneously performed histology in 1418 biopsies from 766 subfertile men. Human Reproduction. 14:82-96.

- 17)** O'Flynn O'Brien KL., Varghese AC., Agarwal A 2010. The genetic causes of male factor infertility. *Fertil Steril* .93(1):1-12.
- 18)** Lamb DJ., Lipshultz LI 2000. Male infertility. recent advances and a look towards the future. *Current Opinion in Urology*.10: 359-362.
- 19)** Keck C., Gerber-Schäfer C., Clad A., Wilhelm C., Breckwoldt M 1998. Seminal tract infections: impact on male fertility and treatment options. *Hum Reprod Update*. 6:891-903.
- 20)** Dohle GR 2003. Inflammatory associated obstructions of the male reproductive tract. *Andrologia*.35: 321-324.
- 21)** Jin-Chun Lu., Yu-Feng Huang., Nian-Qing Lu 2008. Antisperm Immunity and Infertility. *Expert Rev Clin Immunol*. 4(1):113-126.
- 22)** Pastore AL., Palleschi G., Silvestri L., Leto A 2012. Obstructive and Non-Obstructive Azoospermia. ISBN: 978-953-510562-6,
- 23)** Kantartzi P D., Goulis Ch D., Goulis G D., Papadimas I 2007. Male infertility and varicocele: myths and reality. *HIPPOKRATIA* . 3: 99-104.
- 24)** Ferlin A., Raicu F., Gatta V., Zuccarello D., Palka G., Foresta C 2007. Male infertility. role of genetic background. *Reprod Biomed Online*.14: 734–45.
- 25)** Vogt PH 2005. Azoospermia factor (AZF) in Yq11: towards a molecular understanding of its function for human male fertility and spermatogenesis. *Reprod Biomed Online*.10:81–93.

- 26)** Matsumoto K& Wolffe AP 1998.Gene regulation by Y-box proteins: coupling control of transcription and translation. *Trends Cell Biol.* 8:318–323.
- 27)** Wilkinson MF& Shyu AB 2001. Multifunctional regulatory proteins that control gene expression in both the nucleus and the cytoplasm. *Bioessays.* 23, 775–787.
- 28)** Tafuri SR & Wolffe AP1993.Selective recruitment of masked maternal mRNA from messenger ribonucleoprotein particles containing FRGY2 (mRNP4). *J. Biol. Chem.* 268: 24 255–24 261.
- 29)** Gu W.,Tekur S., Reinbold R.,Eppig JJ.,Choi YC., Zheng J Z.,Murray MT& Hecht NB1998.Mammalian male and female germ cells express a germ cell-specific Y-Box protein, MSY2. *Biol Reprod.* 59:1266–1274.
- 30)** Xu M & Hecht NB 2008.MSY2 and polypyrimidine tract binding protein 2 stabilize mRNAs in the mammalian testis. *Int. J.Androl.* 31:457–461.
- 31)** Yang J., Medvedev S., Yu J., Tang LC., Agno JE., Matzuk MM., Schultz RM and Hecht NB2005. Absence of the DNA-/RNA-binding protein MSY2 results in male and female infertility. *Proc Natl Acad Sci USA.*102:5755–5760.
- 32)** Yang J., Morales CR., Medvedev S et al 2007. In the absence of the mouse DNA/ RNA-binding protein MSY2,messenger RNA instability leads to spermatogenic arrest. *Biol Reprod.*76:48–54.
- 33)** Yang J., Medvedev S., Reddi PP., Schultz RM & Hecht NB2005.The DNA/RNA-binding protein MSY2 marks specific transcripts for cytoplasmic storage in mouse male germ cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*102:1513–1518.
- 34)** Bettgowda A and Wilkinson MF2010 .Transcription and post-transcriptional regulation of spermatogenesis.*Phil. Trans. R. Soc. B.*365:1637–1651.

- 35)** Medvedev S., Yang J., Hecht NB & Schultz RM 2008. CDC2A (CDK1) mediated phosphorylation of MSY2 triggers maternal mRNA degradation during mouse oocyte maturation. *Dev Biol.* 321: 205–215.
- 36)** Tekur S., Pawlak A., Guellaen G and Hecht NB 1999. Contrin, the human homologue of a germ-cell Y-box-binding protein: cloning, expression, and chromosomal localization. *J Androl.* 20:135–144.
- 37)** Hammoud S., Emery BR., Dunn D., Weiss RB., Carrell DT 2009. Sequence alterations in the YBX2 gene are associated with male factor infertility. *Fertil Steril.* 91(4):1090-5.
- 38)** Huynh T, Mollard R, Trounson A (2002) Selected genetic factors associated with male infertility. *Hum Reprod Update* 8:183–98.
- 39)** Yang Y, Xiao CY, Zhou-Cun A, Zhang SZ, Li X, Zhang SX (2006) DAZ1/DAZ2 cluster deletion mediated by gr/gr recombination per se may not be sufficient for spermatogenesis impairment: a study of Chinese normozoospermic men. *Asian J Androl* 8:183–7.
- 40)** Totonchi M, Mohseni Meybodi A, Borjian Boroujeni P, Sedighi Gilani M, Almadani N, Gourabi H (2012) Clinical data for 185 infertile Iranian men with Y-chromosome microdeletion. *J Assist Reprod Genet.* 29:847–53.
- 41)** Fernando L, Gromoll J, Weerasooriya TR, Nieschlag E, Simoni M (2006) Y-chromosomal microdeletions and partial deletions of the Azoospermia Factor c (AZFc) region in normozoospermic, severe oligozoospermic and azoospermic men in Sri Lanka. *Asian J Androl* 8:39–44.
- 42)** Ward WS, Coffey DS (1991) DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod* 44:569–574.

- 43)** Carrell DT, Emery BR, Hammoud S (2007) Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Hum Reprod Update* 13:313–27.
- 44)** Kleene KC (1996) Patterns of translational regulation in the mammalian testis. *Mol Reprod Dev* 43:268–81.
- 45)** Kwon YK, Murray M, Hecht NB (1993) Proteins homologous to the *Xenopus* germ cell-specific RNA-binding proteins p54/p56 are temporally expressed in mouse male germ cells. *Dev Biol* 158:90–100.
- 46)** Gu W, Tekur S, Reinbold R, Eppig JJ, Choi YC, Zheng JZ, Murray MT, Hecht NB (1998) Mammalian male and female germ cells express a germ-cell specific Y-box protein MSY2. *Biol Reprod* 59:1266–1274.
- 47)** Oliva R, Bazett-Jones D, Mezquita C, Dixon GH. Factors affecting nucleosome disassembly by protamines in vitro. Histone hyperacetylation and chromatin structure, time dependence, and the size of the sperm nuclear proteins. *J Biol Chem.* 1987 Dec 15;262(35):17016-25.
- 48)** Steger K. Transcriptional and translational regulation of gene expression in haploid spermatids. *Anat Embryol (Berl)*. 1999 Jun;199(6):471-87
- 49)** Hecht NB. Regulation of 'haploid expressed genes' in male germ cells. *J Reprod Fertil.* 1990 Mar;88(2):679-93.
- 50)** Dadoune JP. The nuclear status of human sperm cells. *Micron.* 1995;26(4):323-45.

- 51)** Steger K, Klonisch T, Gavenis K, Drabent B, Doenecke D, Bergmann M. Expression of mRNA and protein of nucleoproteins during human spermiogenesis. *Mol Hum Reprod*. 1998 Oct;4(10):939-45
- 52)** Steger K, Klonisch T, Gavenis K, Behr R, Schaller V, Drabent B, Doenecke D, Nieschlag E, Bergmann M, Weinbauer GF. Round spermatids show normal testis-specific H1t but reduced cAMP-responsive element modulator and transition protein 1 expression in men with round-spermatid maturation arrest. *J Androl*. 1999 Nov-Dec;20(6):747-54.
- 53)** Steger K, Fink L, Klonisch T, Bohle RM, Bergmann M. Protamine-1 and -2 mRNA in round spermatids is associated with RNA-binding proteins. *Histochem Cell Biol*. 2002 Mar;117(3):227-34.
- 54)** Carrell DT, Emery BR, Hammoud S. Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Hum Reprod Update*. 2007 May-Jun;13(3):313-27.
- 55)** Mareello K, LaRovere J, Sommerville J. Binding of *Xenopus* oocyte masking proteins to mRNA sequences. *Nucleic Acids Res*. 1992 Nov 11;20(21):5593-600.
- 56)** Richter JD, Smith LD. Reversible inhibition of translation by *Xenopus* oocyte-specific proteins. *Nature*. 1984 May 24-30;309(5966):378-80
- 57)** Cooke HJ, RNA-binding proteins and human male infertility. Elliott DJ. *Trends Genet*. 1997 Mar;13(3):87-9.
- 58)** Wolffe AP, Tafuri S, Ranjan M, Familiari M. The Y-box factors: a family of nucleic acid binding proteins conserved from *Escherichia coli* to man. *New Biol*. 1992 Apr;4(4):290-8.
- 59)** Wolffe AP Structural and functional properties of the evolutionarily ancient Y-box family of nucleic acid binding proteins. *Bioessays*. 1994 Apr;16(4):245-51.



- 60)** Gu W, Tekur S, Reinbold R, Eppig JJ, Choi YC, Zheng JZ, Murray MT, Hecht NB. Mammalian male and female germ cells express a germ cell-specific Y-Box protein, MSY2. *Biol Reprod.* 1998 Nov;59(5):1266-74.
- 61)** Tafuri SR, Familari M, Wolffe AP. A mouse Y box protein, MSY1, is associated with paternal mRNA in spermatocytes. *J Biol Chem.* 1993 Jun 5;268(16):12213-20.
- 62)** Tafuri SR, Wolffe AP. Selective recruitment of masked maternal mRNA from messenger ribonucleoprotein particles containing FRGY2 (mRNP4). *J Biol Chem.* 1993 Nov 15;268(32):24255-61.
- 63)** Oko R, Korley R, Murray MT, Hecht NB, Hermo L. Germ cell-specific DNA and RNA binding proteins p48/52 are expressed at specific stages of male germ cell development and are present in the chromatoid body. *Mol Reprod Dev.* 1996 May;44(1):1-13.
- 64)** Nikolajczyk BS, Murray MT, Hecht NB. A mouse homologue of the *Xenopus* germ cell-specific ribonucleic acid/deoxyribonucleic acid-binding proteins p54/p56 interacts with the protamine 2 promoter. *Biol Reprod.* 1995 Mar;52(3):524-30.
- 65)** Yiu GK, Murray MT, Hecht NB. Deoxyribonucleic acid-protein interactions associated with transcriptional initiation of the mouse testis-specific cytochrome c gene. *Biol Reprod.* 1997 Jun;56(6):1439-49.
- 66)** Lodomery M, Sommerville J. A role for Y-box proteins in cell proliferation. *Bioessays.* 1995 Jan;17(1):9-11.

**67)** Aoki VW, Christensen GL, Atkins JF, Carrell DT Identification of novel polymorphisms in the nuclear protein genes and their relationship with human sperm protamine deficiency and severe male infertility. *Fertil Steril*. 2006 Nov;86(5):1416-22

**68)** Carrell DT, Liu L. Altered protamine 2 expression is uncommon in donors of known fertility, but common among men with poor fertilizing capacity, and may reflect other abnormalities of spermiogenesis. *J Androl*. 2001 Jul-Aug;22(4):604-10.

**69)** Deng Y, Zhang W, Su D, Yang Y, Ma Y, Zhang H, Zhang S. Some single nucleotide polymorphisms of MSY2 gene might contribute to susceptibility to spermatogenic impairment in idiopathic infertile men. *Urology*. 2008 May;71(5):878-82.

**70)** Kohno et al. (2006)

**71)** Sakthivel AL, 2008

**72)** Dada 2007

**73)** Khazamipour N, Noruzinia M, Fatehmanesh P, Keyhanee M, Pujol P (2009) MTHFR promoter hypermethylation in testicular biopsies of patients with non-obstructive azoospermia: the role of epigenetics in male infertility. *Hum Reprod* 24:2361-4.

**74)** Najafipour R, Moghbelinejad S, Samimi Hashjin A, Rajaei F, Rashvand Z (2015) Evaluation of mRNA Contents of YBX2 and JHDM2A Genes on Testicular Tissues of Azoospermic Men with Different Classes of Spermatogenesis. *Cell J* 17:121-8.

## Summary

Animal model studies have shown, MSY2 gene has a potential role in spermatogenesis. Some mutations on this gene have been proposed to be associated with human male infertility. In this study, polymorphisms of exon1 of YBX2 gene have been investigated. A total of 156 men were evaluated. They included 96 men with normal spermatogenesis, 60 men with non-obstructive azoospermia. We extracted DNA from blood and testis tissues of samples, and analyzed polymorphisms of exon1 by sequencing method. Sequencing results showed that among the studied polymorphisms, frequency of TT genotype in rs222859 polymorphism was significantly higher in azoospermic patients compared to control group ( $P < 0.001$ ). According to our results, YBX2 gene may play a role in male reproduction. The alterations of this gene might be involved in azoospermia among the Iranian population.

**Keywords:** YBX2 gene, Male infertility, Azoospermia